

**Efeitos do Período de Separação Materna e do
Cuidado Materno no Momento da Reunião do Filhote
Isolado, sobre a Ansiedade, Depressão e Ataques de
Pânico na Vida Adulta**

ANA CRISTINA BORGES AGUIAR

Dissertação de Mestrado em Ciências Fisiológicas

Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas

**Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Agosto de 2015**

Efeitos do Período de Separação Materna e do Cuidado Materno no Momento da Reunião do Filhote Isolado sobre a Ansiedade, Depressão e Ataques de Pânico na Vida Adulta

Ana Cristina Borges Aguiar

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas da Universidade Federal do Espírito Santo como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Deborah Suchecki
Departamento de Psicobiologia, EPM-UNIFESP

Profa. Dra. Ester Miyuki Nakamura Palacios
Departamento de de Ciências Fisiológicas, CCS-UFES

Prof. Dr. Luiz Carlos Schenberg – Orientador
Departamento de Ciências Fisiológicas, CCS-UFES

Prof^a. Dr^a. Ivanita Stefanon – Coordenadora do PPGCF
Departamento de Ciências Fisiológicas, CCS-UFES

Universidade Federal do Espírito Santo
Vitória, Agosto de 2015.

Aguiar, Ana Cristina Borges, 1983

Efeitos do Período de Separação Materna e do Cuidado Materno no Momento da Reunião do Filhote Isolado, sobre a Ansiedade, Depressão e Ataques de Pânico na Vida Adulta

(UFES, Ciências Fisiológicas, 2015)

Dissertação, Universidade Federal do Espírito Santo, PPGCF.

1. Cuidado Materno, 2. Separação Materna, 3. Ansiedade,
4. Depressão, 5. Pânico.

AGRADECIMENTOS

**Expresso minha gratidão ao meu orientador Dr. Luiz Carlos Schenberg, pela oportunidade e atenção para realização deste trabalho,
À minha família pelo apoio incondicional.**

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais volta ao seu tamanho inicial”

Albert Einstein

LISTA DE ABREVIATURAS

%EBA	Porcentagem de entrada no braço aberto
%EBF	Porcentagem de entrada no braço fechado
%TBA	Porcentagem de tempo no braço aberto
%TBF	Porcentagem de tempo no braço fechado
μA	Microampere
5-HT	Serotonina
ACe	Núcleo central da amígdala
ACTH	Corticotrofina
ANOVA	Análise de variância
AP	Ataque de pânico
APA	Associação Psiquiátrica Norte Americana
ASI	Ansiedade de separação na infância
CA	Campo aberto
CO ₂	Dióxido de carbono
CORT	Corticosterona
GD	Giro denteado
DM	Depressão maior
DSM	Manual de Estatística e Diagnóstico
EBA	Entrada no braço aberto
EBF	Entrada no braço fechado
EP	Erro padrão
EPM	Erro padrão das médias
GABA	Ácido-γ-amino butírico
HDG	Hipótese Deakin/Graeff
HDM	Hipotálamo dorsomedial
HHA	Eixo hipotálamo-hipófise-adrenal

HPA	Eixo hipotálamo-pituitária-adrenal
ISN	Isolamento social neonatal
ISF	Isolamento social fictício
ISRS	Inibidores seletivos de recaptção de serotonina
KCN	Cianeto de potássio
LAC	Lactato de sódio
LCE	Labirinto-em-cruz elevado
MCPA	Matéria cinzenta periaquedutal
MCPAd	Matéria cinzenta periaquedutal dorsal
MCPAdl	Matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral
MCPAdm	Matéria cinzenta periaquedutal dorso medial
MCPAl	Matéria cinzenta periaquedutal lateral
MCPAv	Matéria cinzenta periaquedutal ventral
MCPAvl	Matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral
NDR	Núcleo dorsal da rafe
NF	Natação forçada
NMnR	Núcleo mediano da rafe
P	Ratos privados
PeF	Hipotálamo perifornicial
PET	Tomografia por emissão positrônica
PN	Dia pós-natal
SM	Separação Materna
TBA	Tempo no braço aberto
TBF	Tempo no braço fechado
TAG	Transtorno de ansiedade generalizada
TP	Transtorno do pânico
TPC	Tempo na plataforma central
VMH	Hipotálamo ventromedial

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização colunar rostro-caudal da MCP. As figuras ilustram as colunas: (a) dorsomedial, (b) dorsolateral, (c) lateral (coluna superior) e ventrolateral (coluna inferior). (Aq) Aqueduto cerebral, (DR) núcleo dorsal da rafe, (III) núcleo óculo-motor.	2
Figura 2. Estudos longitudinais da comorbidade do transtorno do pânico e depressão. (modificado Angst e Wicki, 1993).	17
Figura 3. Ratos sete dias após a cirurgia de implantação dos eletrodos intracranianos.	42
Figura 4. Duração média (\pm EPM) do transporte dos filhotes não-isolados ou isolados por 3 h diárias por 11 ou 20 dias pós-natais. O fundo amarelo indica o período com séries completas que foi submetido à ANOVA para medidas repetidas. * $P < 0,05$, diferente do respectivo dia do grupo SMF, + $P < 0,05$, diferente de PN4....	52
Figura 5. Efeitos da separação materna no teste do labirinto-em-cruz elevado em ratos adultos submetidos à separação materna fictícia (controles) ou à separação materna ao longo dos dias pós-natais PN4-PN14 (11 dias) ou separados em PN2-PN21 (20 dias)...	54
Figura 6. Efeitos da separação materna no teste do campo aberto em ratos adultos submetidos a separação materna fictícia (controles) ou à separação materna ao longo dos dias pós-natais PN4-PN14 (11 dias) ou PN2-PN21 (20 dias). * $P < 0,05$, diferença significativa dos grupos assinalados em relação aos grupos indicados pelas setas (ANOVA de 1 via seguida por testes <i>post hoc</i> de Bonferroni).....	55
Figura 7. Efeitos da separação materna e do cuidado materno no teste da natação forçada em ratos adultos submetidos à separação materna fictícia (controles) ou à separação materna ao longo dos dias pós-natais PN4-PN14 (11 dias) ou PN2-PN21	

(20 dias). * $P < 0,05$, diferenças significantes do grupo assinalado em relação aos grupos indicados pelas setas (ANOVA de 1 via seguida por testes *post hoc* de Bonferroni)..57

Figura 8. Efeitos da separação materna e do cuidado materno na frequência de lambidas (gráfico superior) e no consumo (gráfico inferior) de uma solução de sacarose (1%) em ratos adultos que foram submetidos à separação materna fictícia (controles) ou à separação materna entre PN4-PN14 (11 dias) ou PN2-PN21 (20 dias). * $P < 0,05$, diferença significativa dos grupos assinalados em relação aos grupos indicados pelas setas (ANOVA de 1 via seguida por testes *post hoc* de Bonferroni).58

Figura 9. Efeitos da separação materna e do cuidado materno no peso de ratos adultos que foram submetidos à separação materna fictícia (controles) ou ao separação materna entre PN4-PN14 (11 dias) ou PN2-PN21 (20 dias). * $P < 0,05$, estatisticamente diferente das colunas indicadas pelas setas (ANOVA de uma via seguida de testes-t de Bonferroni).59

Figura 10. Efeitos da separação materna e do cuidado materno no pânico experimental produzido pela estimulação da matéria cinzenta periaquedutal de ratos adultos. Os símbolos indicam diferenças significantes dos grupos assinalados em relação aos grupos indicados pelas setas em testes *post hoc* de Bonferroni ($P < 0,05$) para a ANOVA de 1 via de todos os grupos (*) ou para a ANOVA de 2 vias somente dos grupos submetidos à SM (#).61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Isomorfismo dos AP e das respostas induzidas por estimulação da MCPAd em homens e ratos	15
Tabela 2. Sumário da ANOVA de duas vias dos efeitos do cuidado materno e do período de separação materna sobre os limiares das respostas de pânico experimental dos grupos submetidos a separação materna. Os limiares de defecação, micção e salto não apresentaram alterações significativas.	60

SUMÁRIO

1. RESUMO	6
2. ABSTRACT	4
3. REVISÃO: EFEITOS TARDIOS DO ESTRESSE NA INFÂNCIA.....	7
3.1. Transtornos de Ansiedade.....	8
3.2. Papel da matéria cinzenta periaquedutal no transtorno do Pânico.....	11
3.3. Teorias Neurais do Transtorno do Pânico	13
3.4. Comorbidade do transtorno do pânico com ansiedade e depressão.....	16
3.5. Neuroplasticidade e desenvolvimento de psicopatologias.....	25
3.6 Efeitos do estresse de separação da infância na ansiedade, depressão e pânico dos ratos adultos... ..	30
4. OBJETIVOS.....	32
4.1. Objetivo geral.....	33
4.2. Objetivos específicos.....	33
ESTUDO:	
EFEITOS DO PERÍODO DE SEPARAÇÃO MATERNA E DO CUIDADO MATERNO NO MOMENTO DA REUNIÃO DO FILHOTE À MÃE, NA ANSIEDADE, PÂNICO E DEPRESSÃO NA VIDA ADULTA.	34
5. INTRODUÇÃO	35
6. MATERIAIS E MÉTODOS	38
Animais	38
Separação materna.....	39
Eletrodos	40

Cirurgia.....	41
Estimulação intracraniana	42
Registros comportamentais à estimulação intracraniana	43
Teste de consumo de sacarose	45
Teste do campo aberto	47
Teste do labirinto-em-cruz elevado	47
Teste da natação forçada.....	48
Histologia.....	48
Estatística	49
Análise do comportamento das mães	49
Análise do comportamento dos ratos adultos submetidos à SM.....	50
RESULTADOS	51
Comportamento das mães de proles isoladas e não-isoladas.....	51
Efeitos da separação materna e cuidado materno no desempenho no LCE	51
Efeitos da separação materna e cuidado materno no desempenho no CA	55
Efeitos da separação materna e cuidado materno no desempenho no TA.....	53
Efeitos da separação materna e cuidado materno sobre o desempenho da NF.....	53
Efeitos do cuidado materno e da separação materna sobre o peso dos ratos.....	58
Efeitos da SM e cuidado materno sobre o pânico experimental à estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal	59
DISCUSSÃO	62
CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS.....	70

1. RESUMO

Efeitos do período de separação materna e do cuidado materno no momento da reunião do filhote isolado sobre a ansiedade, depressão e ataques de pânico na vida adulta. Evidências abundantes sugerem que a separação materna (SM) predispõe o indivíduo ao desenvolvimento de ansiedade e depressão na vida adulta. Contudo, não está claro se esses efeitos resultam da separação materna em si ou do excesso de cuidados maternos no momento da reunião do filhote separado ao ninho. Portanto, o presente estudo examinou os efeitos de cuidados maternos e do período da SM sobre a ansiedade e depressão na vida adulta. Para isto, filhotes de ratos Wistar machos (n=106) foram submetidos à SM de 3 h diárias a partir do segundo dia pós-natal (PN2) até o desmame em PN21 (n=40), ou à SM no 'período hiporresponsivo ao estresse' de PN4 a PN14 (SHRP, n=40). Destes, cerca de metade dos filhotes foi reunida a uma mãe consciente e a outra metade a uma mãe anestesiada, carecendo, portanto, dos cuidados maternos (carrear, carícias anogenitais). Embora não tenham sido separados, os controles (n=16) foram sujeitos a manipulação similar ao grupo separado ao longo da lactação. Após o desmame, os ratos foram alojados em gaiolas individuais numa sala com temperatura controlada e atenuação sonora com água e comida *ad libitum* e ciclo claro-escuro de 12 h (luzes acesas às 6:00). Quando adultos, os ratos foram avaliados quanto à sua vulnerabilidade aos ataques de pânico experimentais à estimulação elétrica da MCPA (PN62), à depressão nos testes de anedonia por consumo de sacarose (TCS, PN67) e resiliência à natação forçada (NF, PN83), e à ansiedade nos testes do labirinto-em-cruz elevado (LCE, PN74) e campo aberto (CA, PN75). O desempenho dos ratos foi filmado e analisado *offline*. As diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5% de Bonferroni. Os resultados sugerem que (i) a SM não tem efeito algum sobre a ansiedade de ratos adultos expostos ao LCE e CA; (ii) a

SM no SHRP aumenta os índices de depressão na NF e TA, (iii) a SM no SHRP facilita o pânico experimental nos ratos adultos, (iv) a SM ao longo de toda a lactação aumenta o prazer e a resiliência de ratos adultos expostos ao TA e NF, respectivamente, (v) a SM ao longo da lactação resulta em ganhos maiores de peso, (vi) o cuidado materno no momento da reunião tem efeitos pequenos isoladamente, mas potencia a facilitação do pânico e da depressão nos ratos separados durante o SHRP. Portanto, o presente estudo sugere que os efeitos da SM dependem fortemente do período em que ela é realizada. Este é o primeiro estudo sobre os efeitos da negligência materna no momento da reunião do filhote isolado à ninhada sobre a ansiedade, depressão e pânico na vida adulta.

Palavras chave: Cuidado Materno, Separação Materna, Ansiedade, Depressão, Pânico.

2. ABSTRACT

Effects of the period of maternal separation and of maternal care at the time of the reunion of the separated pup on anxiety, depression and panic attacks in adulthood. Abundant evidence suggests that maternal separation (MS) predisposes individuals to the development of anxiety and depression in adulthood. However, it is unclear whether these effects result from maternal separation itself or to the excess of maternal care at the time of the reunion of the separated pup to the nest. Therefore, the present study examined the effects of maternal care and MS period on anxiety and depression in adulthood. For this, Wistar rat pups ($n = 106$) underwent a 3-h daily MS either from the second postnatal day (PN2) until weaning at PN21 ($n = 40$) or from PN4 to PN14, the 'stress hyporesponsive period' (SHRP, $n=40$). Of these, about half of the pups were reunited to a conscious mother and the other half to an anesthetized mother, being thus devoid of maternal care (carrying, anogenital stroke). Although not separated, the controls ($n=16$) were subjected to similar manipulations along the lactation. After weaning, the rats were housed in individual cages in a room with controlled temperature and sound attenuation with food and water ad libitum and light-dark cycle of 12 h (lights on at 6:00). As adults, the rats were assessed for their vulnerability to panic attacks to electrical stimulations of periaqueductal gray matter (PN62), to depression in sucrose consumption test of anhedonia (TA, PN67) and forced swimming test of resilience (FS, PN83), and to anxiety to the exposure to the elevated-plus-maze (EPM, PN74) and open-field (OF, PN75). The performance of the rats was filmed and analyzed offline. Differences were considered significant at 5% Bonferroni. The results suggest that (i) the MS has no effect on anxiety of adult rats exposed to EPM and OF; (ii) the MS in the SHRP increases depression indices in FS and TA (iii) the MS in the SHRP facilitates the experimental panic in adult rats (iv) the MS throughout lactation increases both

pleasure and resiliency of adult rats exposed to TA and FS, respectively, (v) the MS throughout the lactation increases appetite, thereby resulting in higher weight gains, (vi) although the maternal attention at the time of the reunion have small effects alone, it enhances the facilitation of panic and depression in adult rats subjected to MS during the SHRP. Therefore, this study suggests that the effects of MS depend strongly on the period in which it is performed. This is the first study on the effects of maternal neglect at the time of the reunion of the isolated pup on anxiety, depression and panic in adulthood.

Keywords: Maternal care, Maternal separation, Anxiety, Depression, Panic.

REVISÃO: EFEITOS TARDIOS DO ESTRESSE NA INFÂNCIA

3.1. Transtornos de Ansiedade

Os transtornos de ansiedade foram primeiramente classificados nos estudos pioneiros de Sigmund Freud (1896) sobre as “neuroses de ansiedade” (*Angstneurose*). Nestes estudos, Freud distinguiu estes transtornos tanto da depressão maior (melancolia) quanto de uma ampla gama de condições psiquiátricas denominadas à época de “neurastenias”. Nos “*Estudos Seleccionados sobre a Histeria*” (Freud, 1896), Freud identificou duas síndromes fundamentais de ansiedade, quais sejam, a “expectativa ansiosa” ou “apreensão” (*ängstliche Erwartung*), que ele considerava a forma predominante do transtorno de ansiedade, e uma síndrome menos freqüente, que ele denominou “ataque de ansiedade” (*Angstanfall*). De acordo com suas descrições, a expectativa ansiosa consistia num “*quantum* de ansiedade livre e flutuante que controlava a escolha de idéias por antecipação”. Em contraste, nos ataques de ansiedade a “ansiedade irrompia repentinamente na consciência sem ter sido eliciada por qualquer idéia”. Freud ressaltou que estes ataques podiam manifestar-se tanto como “um sentimento puro de ansiedade” quanto pela combinação da ansiedade com “a interpretação mais próxima do término da vida, tal como a idéia de morte súbita ou da perda da razão” ou combinados a “alguma parestesia” ou a “distúrbio de uma ou mais funções somáticas, tais como a respiração, atividade cardíaca, inervação vasomotora e atividade glandular”. Freud distinguiu estes ataques das fobias, do transtorno obsessivo-compulsivo (neurose obsessiva) e transtorno do estresse pós-traumático (neurose comum), dentre outras condições. Suas descrições clínicas de

“expectativa ansiosa” e “ataque de ansiedade” são bastante similares aos diagnósticos atuais do transtorno de ansiedade generalizada (TAG) e transtorno do pânico (TP), respectivamente. Associação Psiquiátrica Norte Americana (APA, 2000).

Contudo, enquanto os transtornos de ansiedade continuaram a ser diagnosticados como neurastenias até meados do século passado, o TP recebeu uma variedade enorme de nomes, incluindo neurose da ansiedade, reação de ansiedade, neurastenia, astenia neurocirculatória, neurose vasomotora, taquicardia nervosa, síndrome de esforço, síndrome de Da Costa, coração de soldado e coração irritável, síndrome de hiperventilação, entre outros (Pitts e McClure, 1967).

Este contexto começou a alterar-se após o estudo pioneiro de Donald Klein (1964) que demonstrou a sensibilidade farmacológica específica do TP. Klein mostrou que enquanto a “expectativa ansiosa” era tratável por ansiolíticos (barbitúricos, meprobamato, e clordiazepóxido) e doses baixas de sedativos (fenotiazinas), os ataques de pânico (AP) só puderam ser tratados pela administração crônica do antidepressivo tricíclico imipramina.

Pitts e McClure (1967) demonstraram que os AP podiam ser precipitados pela infusão endovenosa de lactato de sódio (LAC) em pacientes predispostos aos ataques espontâneos de pânico, mas não em voluntários normais. Na realidade, estudos prévios de Cohen e White (1951) já haviam mostrado que os AP podiam ser precipitados por hiperventilação em 5% de dióxido de carbono (CO₂), mas não no exercício ou na ventilação ambiente (Klein, 1993). Estudos posteriores forneceram provas numerosas das propriedades panicogênicas do LAC e CO₂, bem como de outros agentes (Graeff et al., 2005). Posteriormente, mostrou-se que a ioimbina, um antagonista α -2 adrenérgico, também induzia pânico nos pacientes de TP

(Charney e Manji, 2004). Contudo, a infusão de ioimbina também provocava o aumento da ansiedade em pessoas normais, tal como ocorre com a cafeína, colecistocinina (CCK) e inúmeras drogas com ação panicogênica (Klein, 1993). Ainda, enquanto os AP induzidos por inalação de CO₂ e infusão endovenosa de LAC eram bloqueados pelo tratamento crônico com antidepressivos tricíclicos (Gorman et al., 1997; Liebowitz et al., 1985b; Rifkin et al., 1981; Woods et al., 1990; Yeragani et al., 1988), os AP induzidos por β -carbolina e ioimbina em indivíduos saudáveis eram atenuados por baixas doses de diazepam, mas não pelos tricíclicos (Dorow et al., 1983; Klein, 1993). A sensibilidade específica às drogas e a existência de marcadores fisiológicos do TP sugeriram a existência de um circuito cerebral disparando de forma não adaptativa.

O TP somente foi reconhecido como entidade nosológica a partir de 1980 (EUA), quando foi incluído no Manual de Estatística e Diagnóstico da Associação Psiquiátrica Norte Americana, o DSM-III (APA, 1980), aproximadamente um século após as observações pioneiras de Freud.

Os AP são transtornos de ansiedade com episódios agudos de medo, ou sensação similar, que ocorrem de forma recorrente e na ausência de qualquer ameaça identificável. Eles caracterizam-se por uma experiência súbita de intenso estresse, pensamentos catastróficos e ansiedade grave, que se desenvolvem rapidamente, atingindo um pico em aproximadamente 10 min. Os principais sintomas dos AP na clínica são taquicardia, dor precordial, dificuldade de respirar (dispnéia) e sensação de sufocamento, seguidas de hiperventilação, suor, vertigem, tremores, desejo de fuga e sensação de morte iminente (Freedman et al., 1985; Stein et al., 1992; Goetz et al., 1994; Rechlin et al., 1994). A descrição clínica de

Freud para o “ataque de ansiedade” já incluía 10 dos 13 sintomas necessários para o diagnóstico do TP quando este foi introduzido no DSM-III (APA, 1980).

De acordo com os critérios clínicos para o diagnóstico do TP estabelecidos a partir do DSM-III (APA, 1980). O TP é definido como a ocorrência de quatro ataques espontâneos em quatro semanas ou um ataque seguido pelo receio de novos ataques ao longo de quatro semanas. Também ficou estabelecida a distinção entre ataques completos, com mais de quatro sintomas (dentre 12 ou 13 característicos), ou ataques limitados, com número inferior de sintomas. Por sua vez, os AP situacionais estão relacionados à expectativa do paciente de desenvolver sintomas que se assemelham aos dos AP em um determinado local ou contexto. Essa ansiedade é gradual, até que o indivíduo se confronte com a situação temida e ocorra um AP (Gentil, 1988).

O TP pode acarretar em enorme prejuízo aos indivíduos, principalmente, se for acompanhado de agorafobia, limitando as atividades sociais e profissionais de forma parcial ou completa. Devido à ausência de explicação dos sintomas e às frequentes consultas e exames médicos, geralmente negativos, os AP também desenvolvem insegurança e perda da autoestima, com grande desconforto físico e emocional. Com um custo social elevado, estimativas europeias avaliam que 7,5 a 10% da população adulta, entre 20 e 30 anos, terão AP ocasionais e 2% a 5% desenvolverão o TP, isto é, AP recorrentes com graves limitações do desempenho.

3.2. Papel da matéria cinzenta periaquedutal no transtorno do Pânico

A distribuição anatômica da matéria cinzenta periaquedutal (MCPA) de ratos, gatos e humanos é organizada em colunas morfofuncionais dispostas ao longo do aqueduto, quais sejam, colunas dorsomedial (MCPAdm), dorsolateral

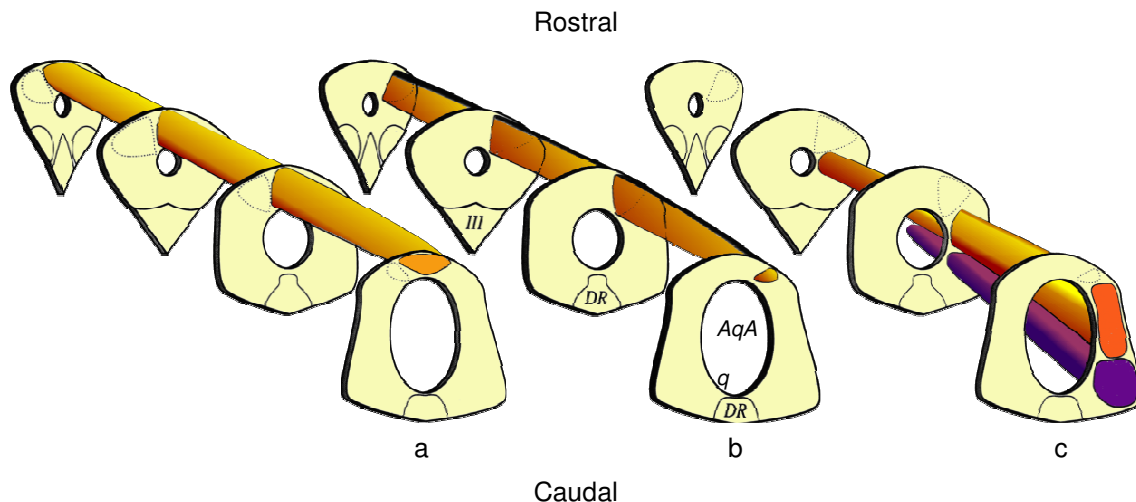


Figura 1. Organização colunar rostro-caudal da MCP. As figuras ilustram as colunas: (a) dorsomedial, (b) dorsolateral, (c) lateral (coluna superior) e ventrolateral (coluna inferior). (Aq) Aqueduto cerebral, (DR) núcleo dorsal da rafe, (III) núcleo óculo-motor.

(MCPAdl), lateral (MCPAl) e ventrolateral (MCPAvl), e cada uma dessas formam uma coluna longitudinal que varia ao longo do eixo rostro caudal (Keay and Bandler, 2004; Parvizi et al., 2000).

Um modelo proposto para o estudo dos AP é a estimulação elétrica ou química da metade dorsal da matéria cinzenta periaquedutal (MCPAd) que elicia respostas de reação de defesa (Gentil, 1988; Jenck et al., 1995; Deakin and Graeff, 1991; Schenberg et al., 2001, 2005). Assim, enquanto a estimulação da MCPD com intensidades baixas produz a “reação de congelamento” (exoftalmia e imobilidade tensa), as intensidades mais elevadas desencadeiam respostas de fuga (trotes, galopes e saltos) (Schenberg et al., 1993, 2005; Bittencourt et al., 2004).

3.3. Teorias Neurais do Transtorno do Pânico

Duas teorias foram propostas para esclarecer as bases neurais do TP: A primeira delas, proposta por Deakin & Graeff (1991), baseia-se em estudos experimentais sobre o papel da serotonina (5HT) nos comportamentos defensivos e na prescrição dos inibidores seletivos de recaptura de 5HT (ISRS) para uma ampla gama de transtornos psiquiátricos, incluindo o TAG e o TP, mas também, o transtorno obsessivo compulsivo e a depressão. Brevemente a teoria propõe que a 5HT facilita a ansiedade por uma ação na amígdala, mas inibe os AP por uma ação na matéria cinzenta periaquedutal (MCPA). Segundo a teoria de Deakin & Graeff (1991), a MPCA seria um centro de coordenação de reflexos defensivos a predadores ou outros estímulos nocivos, como dor ou hipóxia. Esta teoria sugere que os AP são estados similares ao medo a uma ameaça proximal, tal como a reação da presa face ao predador. A teoria também sugere a evolução do sistema serotoninérgico como um sistema especializado no controle de situações aversivas. Conseqüentemente, os AP seriam devidos ao funcionamento inadequado das projeções serotoninérgicas do núcleo dorsal da rafe (NDR) à MPCA. Deakin e Graeff (1991) também propuseram que os eferentes serotoninérgicos do núcleo mediano da rafe (NMnR) para o hipocampo seriam o substrato de um “sistema comportamental de resiliência” que teria por função “separar” os eventos aversivos dos afazeres do dia-a-dia, permitindo que o indivíduo se adaptasse às situações de estresse. A elevação dos níveis de glicocorticoides durante o estresse prolongado resultaria na sub-regulação dos receptores, serotonina (5-HT_{1A}) do hipocampo, causando uma

falha no “sistema de resiliência” e desencadeando a depressão. Do ponto de vista do estudo, a implicação mais importante desta teoria seria que a 5-HT facilita a ansiedade no córtex pré-frontal e amígdala, mas inibe o pânico na MCPAd.

A segunda teoria, proposta por Klein (1993, a), baseia-se nos sintomas respiratórios do pânico clínico, na resposta exagerada dos pacientes com diagnóstico de pânico à inalação de concentrações baixas de CO₂ (5-7%) e à infusão endovenosa de LAC (0,5 M), na ausência de respostas endócrinas nos AP e na sensibilidade específica dos AP ao tratamento crônico com imipramina. A teoria postula que os AP seriam devidos ao disparo inadequado de um sistema de alarme de sufocamento, produzindo os ataques espontâneos em ar ambiente, ou ataques induzidos por LAC ou CO₂. Nos estudos pioneiros em que descobriu a sensibilidade dos AP à imipramina, Klein (Klein e Fink, 1962; Klein, 1964) observou que metade dos pacientes com TP sofreram ansiedade de separação da infância (ASI, *childhood separation anxiety*) tão grave que impedia o comparecimento dos mesmos à escola. Conseqüentemente, Klein (1964) propôs que ASI predispõe ao desenvolvimento de AP na vida adulta.

Recentemente, Klein e Preter (2007) propuseram que o elo comum entre relações parenterais e sintomas respiratórios dos AP reside numa deficiência da transmissão opióidegica comum aos sistemas de alarme de sufocamento e separação.

Tabela 1. Isomorfismo dos AP e das respostas induzidas por estimulação da MCPAd em homens e ratos (referências, ver o texto).

	AP espontâneos ou induzi-dos por LAC em homens	Estimulação da MCPAd em homens	Estimulação da MCPAd em ratos
Sensações/ comportamento	“bloqueio do andar” desejo de fugir intenso desconforto ansiedade grave pânico, terror medo de morte iminente medo de ficar louco medo de perder o controle	n.d. interrupção do estímulo intenso desconforto ansiedade grave pânico, terror “medo de morrer” n.d. n.d.	congelamento fuga aversão n.d. n.d. n.d. n.d. n.d.
Respostas autônômicas	taquipnéia hiperventilação dispneia sensação de asfixia taquicardia hipertensão n.d. sudorese n.d.	taquipnéia hiperventilação apneia respiração profunda taquicardia n.d. abertura dos olhos n.d. piloereção	taquipnéia hiperventilação n.o. respiração profunda taquicardia hipertensão exoftalmia n.d. n.o.
Respostas neurológicas/ Parestesias	sensação de tremor dor torácica sensação de calor/frio tonteira n.d. n.d.	sensação de vibração dor precordial sensação de calor/frio n.d. entorpecimento dor facial medial	n.d. n.d. n.d. n.d. n.d. n.d.
Áreas cerebrais estimuladas ou ativadas	MCPAd, camadas profundas do colículo superior, amígdala (PET)	MCPAd e teto adjacente (0-5mm lateral ao aqueduto) (raio-x)	MCPAd, camadas profundas do colículo superior

n.d. - não disponível; n.o. - não observado.

Contudo, Shekhar et al. (1996) apresentam evidências indicando que o hipotálamo dorsomedial (HDM) seja o responsável pelo desencadeamento dos AP ao LAC. Eles sugeriram que a disfunção crônica da neurotransmissão GABAérgica do HDM seja responsável pelo TP. É importante notar, no entanto, que os comportamentos analisados por Shekhar são modelos mais adequados do TAG que do TP.

Evidências pré-clínicas do nosso laboratório sugerem que a MCPA também esteja envolvida nas respostas comportamentais ao sufocamento. Assim, Schimitel et al. (2012) mostraram que sinais de hipóxia produzidos pela estimulação seletiva

dos quimiorreceptores por doses subletais de cianeto de potássio (KCN) produzem comportamentos de defesa similares àqueles da estimulação elétrica ou química da MCPAd. Mais importante, enquanto doses subliminares de KCN potenciou as respostas de defesa à estimulação elétrica da MCPAd, a lesão desta estrutura aboliu as respostas de defesa à administração isolada do KCN. Embora a exposição ao CO₂ (8% e 13%), isoladamente, tenha inibido os comportamentos de defesa eliciados pela estimulação da MCPAd, a exposição ao CO₂ potenciou as respostas de fuga induzidas pela administração de KCN. Os autores concluíram que a MCPAd abriga um sistema de alarme de sufocamento sensível à hipóxia, cuja disfunção desencadearia os AP e tornaria os indivíduos hipersensíveis ao CO₂. Este estudo também sugere que o mecanismo fundamental do sistema de alarme de sufocamento esteja relacionado à hipóxia, e não à hipercapnia. Mais recentemente, Schimitel et al. (2014) mostraram que as respostas de fuga ao KCN são suprimidas pelos tratamentos agudo e crônico com doses clínicas dos panicolíticos clonazepam e fluoxetina, respectivamente. Estes resultados são evidências importantes do envolvimento da MCPAd nos comportamentos de defesa ao sufocamento.

Assim, apesar das respostas induzidas pela estimulação da MCPAd terem sido originalmente consideradas como um modelo de ansiedade em procedimentos de condicionamento operante (Graeff, 1988; Schenberg e Graeff, 1978), as respostas aversivas inatas induzidas pela estimulação da MCPAd têm sido propostas como um paradigma experimental dos AP (Deakin e Graeff, 1991; Gentil, 1988; Jenck et al., 1995; Schenberg et al, 2001). O isomorfismo dos AP e das respostas induzidas pela estimulação da MCPAd está ilustrado na Tabela 1.

3.4. Comorbidade do transtorno do pânico com ansiedade e depressão

Estudo clínicos e epidemiológicos mostraram que existe uma alta comorbidade entre depressão, ansiedade e TP, com ou sem agorafobia. Adicionalmente, alguns autores sugerem que a comorbidade do TP e agorafobia só é observada quando o pânico está associado a depressão (Thompson et al, 1989).

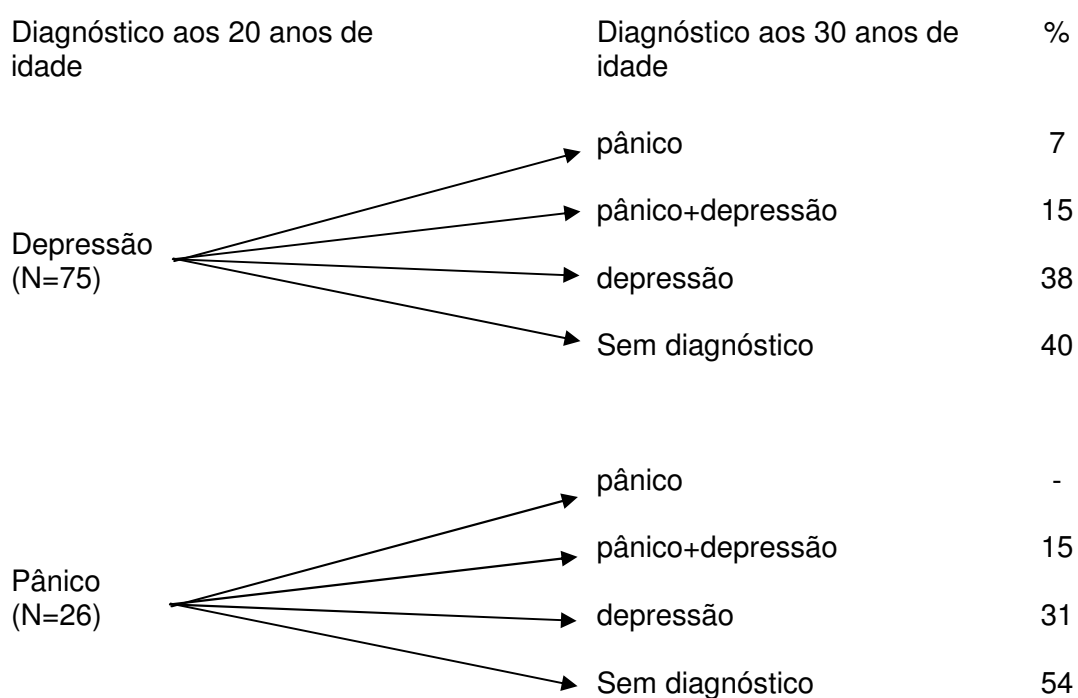


Figura 2. Estudos longitudinais da comorbidade do transtorno do pânico e depressão. (modificado Angst e Wicki, 1993).

Pacientes com TP e depressão também apresentam ataques mais severos de pânico e um risco maior de suicídio (Jonhson e Lyard, 1998; Lecrubier, 1998; Lecubrier e Ustun, 1998; Kaufman e Charney, 2000).

Adicionalmente, os estudos pioneiros de Klein (Klein e Fink, 1962; Klein, 1964) foram confirmados por inúmeras evidências clínicas de que tanto a ASI como

a perda social sejam fatores predisponentes do desenvolvimento da depressão e TP (Klein e Fink, 1962; Roy-Byrne et al., 1986, 2000; Zeanah, 1988; Faravelli e Pallanti, 1989; Klein, 1993; Klein 1995; Battaglia et al., 1995; Kaunonen et al., 2000; Milrod et al., 2004; Preter e Klein, 2008). Esta possibilidade é intrigante uma vez que a ASI e TP são quadros clínicos bastante distintos (Klein, 1995).

Notavelmente, a ASI é o transtorno de ansiedade mais frequente na juventude, responsável por quase 50% dos tratamentos de saúde mental de crianças (Bell-Dolan, 1995; Cartwright-Hatton et al., 2006). É um transtorno no qual a separação da criança da figura de apego, geralmente a mãe, é acompanhada de ansiedade excessiva (DSM-IV-TR, APA, 2000). Klein (1980, 1995) descreve a ASI como um conjunto de sintomas e comportamentos de ansiedade que refletem a ativação de um sistema de alarme neurofisiológico que protege o jovem de rupturas reais, ou potenciais dos laços familiares.

As crianças que apresentam sintomas de ASI tornam-se significativamente angustiadas quando separadas de sua casa ou da figura de apego (geralmente a mãe) e, muitas vezes, tomam medidas para evitar esta separação. Este medo é exibido por meio de uma preocupação desproporcional e persistente sobre a separação. Os comportamentos típicos de crianças que apresentam o transtorno da ASI são o apego excessivo aos pais e a recusa em participar de atividades que requerem separação (ir à escola, participar de acampamentos, dormir na casa de amigos, etc.). Na sua forma mais grave, a ASI pode resultar em recusa escolar grave, resultando em déficits significativos na educação e socialização da criança. Last et al. (1987) estimaram que aproximadamente 75% das crianças com ansiedade de separação apresentam alguma forma de recusa escolar.

Freqüentemente crianças com ASI são sintomáticas, relatam dores de estômago e cabeça e náuseas mais freqüentemente do que as crianças diagnosticadas com transtornos fóbicos (Last, 1991). Por exemplo, as queixas somáticas ocorrem geralmente no contexto de situações de separação, podendo refletir tanto uma estratégia de evasão, chamando a atenção para si, ou um sintoma físico genuíno (Albano et al., 1996; Tonge, 1994). A ASI pode interferir não somente na criança que apresenta a psicopatologia, mas também nas figuras de apego bem como nos demais membros da família. As crianças podem apresentar ataques de fúria, agarrando-se aos pais ou recusando-se em ficar sozinhas face a situações de separação (Tonge, 1994). Pais mudam sua rotina, como dormir na cama da criança, não deixar o filho aos cuidados de outras pessoas e renunciar o tempo com seu cônjuge, a fim de satisfazer as vontades da criança e aliviar o seu sofrimento. Essas modificações podem levar à instabilidade familiar. Além disso, crianças com ASI geralmente desenvolvem um vínculo muito mais estreito e dependente com a figura materna, gerando um comportamento de exclusão da figura paterna e desestabilizando a estrutura familiar (Bernstein e Borchardt, 1996).

É importante lembrar que a experiência de ansiedade de separação é um fenômeno normal que diminui com o amadurecimento da criança. Um diagnóstico de ASI só pode ser estabelecido quando a angústia da criança durante a separação é inadequada, levando em consideração a sua idade e nível de desenvolvimento (APA, 2000). Pesquisas sugerem que 4,1% das crianças exibem um nível clínico de ASI, e que, aproximadamente, um terço dos casos na infância (36,1%) persiste na idade adulta se não houver um tratamento na infância (Shear et al., 2006).

A ASI também parece predispor o indivíduo ao desenvolvimento de diversas psicopatologias na vida adulta, em particular a depressão maior (DM) e o TP (Klein,

1993b; Blandin et al, 1994; Lipsitz et al., 1994; Canetti et al., 1997; Manicavasagar, 1998; Fava e Kendler, 2000; Heim e Nemeroff, 2001; Biederman et al., 2004; Doerfler et al, 2008; Klauke et al., 2010; Mroczkowski et al., 2011). Kagan et al. (1988) sugerem que pacientes com TP desenvolvem, primeiro, a ASI, seguida de fobia social na adolescência e TP na vida adulta. A eficácia do panicolítico imipramina na terapia da ASI confirmou a relação entre ASI e TP (Bernstein et al., 2000; Gittelman-Klein e Klein, 1973). Estas observações, juntamente com a teoria de apego e abordagens etológicas de ansiedade de Bowlby (1973), bem como as propostas estabelecidas por Klein (1980) impulsionaram o desenvolvimento das classificações contemporânea dos transtornos de ansiedade.

Mais recentemente, Rachel G. Klein (1995) conduziu o único estudo prospectivo comparando o desenvolvimento de transtornos psiquiátricos (n=60) em portadores de recusa escolar grave (n=54). Além do caráter prospectivo, o estudo tem especial importância por ser baseado em entrevistas clínicas conduzidas por profissionais que desconheciam o histórico infantil dos indivíduos. Os resultados mostraram que o aumento da frequência de AP foi a única condição psiquiátrica estatisticamente significativa nos pacientes com ASI (7% nos probandos versus 0% nos controles). Este índice também foi maior que a prevalência de TP em adultos, estimada entre 1,2 a 2-3% (Angst e Wick, 1993). Contudo, Klein (1995) também observou uma tendência ($P<0,10$) para o desenvolvimento da DM e uma incidência significativamente maior de hospitalizações ($P<0,02$) devida, principalmente, a episódios agudos de depressão (14%) quando comparados aos controles (1,7%). Estes episódios depressivos podem ser equivalentes à “depressão breve recorrente” observada em 40 de 96 pacientes com TP no estudo de Angst e Wick (1993). O início dos AP também é frequentemente precipitado pela separação, perda social,

estresse familiar ou luto (Battaglia et al., 1995; Faravelli e Pallanti, 1989; Kaunonen et al., 2000; Klein e Fink, 1962; Klein, 1993; Milrod et al., 2004).

Adicionalmente, Biederman et al. (2007) forneceram dados importantes sobre a correlação entre a ASI e o TP. Em seu estudo, foram avaliadas 233 crianças com riscos variados para TP e DM. Embora o estudo realizado por Klein (1995) somente tenha apontado correlações significantes da ASI com TP e internações por episódios depressivos, Biederman et al. (2007) relataram que probandos com ASI apresentaram probabilidades de desenvolvimento de TP, agorafobia e DM 9,2, 9,1 e 3,2 vezes maiores que os controles, respectivamente. Contudo, Preter e Klein (2008) argumentam que os estudos que sugerem que a ASI predispõe o desenvolvimento de vários transtornos psiquiátricos podem ser devidos à inconsistência dos métodos de entrevista ou a diagnósticos ambíguos de AP com sintomas limitados.

No mesmo sentido, Pine et al. (2000, 2005) observaram uma correlação significativa entre a desregulação respiratória e os transtornos de ansiedade na infância. De fato, estes autores mostraram que a hipersensibilidade respiratória à inalação de uma mistura com 5% de CO₂ foi significativamente maior nas crianças com ASI e, em menor grau, no TAG, que nas crianças com fobia social. Estes dados estão de acordo com a hipótese ampliada do alarme falso de sufocamento que sugere que o TP e a ASI estão relacionados a uma anormalidade em mecanismos opióides envolvidos tanto no controle da respiração quanto nas relações parentais (Preter e Klein, 2008; Preter et al., 2011).

Recentemente, Roberson-Nay et al. (2012) utilizaram a decomposição de Cholesky de um extenso banco de dados de gêmeos mono e dizigóticos (n=1437

pares) para analisar a influência de fatores genéticos e ambientais no desenvolvimento de AP na vida adulta. Nesta compilação, os autores analisaram a influência tanto da contribuição genética quanto dos fatores ambientais únicos ou compartilhados da vida adulta e da infância, respectivamente. Este estudo mostrou que 34,8% dos AP da vida adulta são determinados pelo mesmo conjunto de genes responsável por 39% dos casos de ASI. Surpreendentemente, estes autores mostraram que os fatores únicos do ambiente adulto determinam 64% dos AP da vida adulta, enquanto os fatores compartilhados do ambiente infantil foram responsáveis por apenas 1,2%. A influência desprezível do ambiente infantil nos AP da vida adulta é, no mínimo, intrigante.

A despeito dos resultados negativos de Roberson-Nay et al. (2012), a influência do ambiente infantil na etiologia do TP foi sugerida por estudos pré-clínicos que mostraram que ratos submetidos ao isolamento social neonatal (ISN), um modelo de ASI no qual um filhote é separado tanto da mãe quanto dos irmãos, apresentam uma facilitação sexo-dependente das respostas respiratórias à hipóxia (machos) e à hipercapnia (fêmeas) na vida adulta (Genest et al., 2007a, 2007b, 2004). Adicionalmente, estudos recentes do nosso laboratório (Quintino-dos-Santos et al., 2014) mostraram que ratos adultos submetidos ao ISN por 3 horas diárias ao longo de todo período de amamentação (21 dias) apresentaram reduções acentuadas dos limiares das respostas de defesa de imobilidade, exoftalmia, trote, galope e salto produzidas pela estimulação elétrica da MCPAd. Este estudo foi a primeira evidência em animais da influência facilitatória do estresse de separação na infância no desenvolvimento dos AP na vida adulta. Adicionalmente, estes dados sugerem que o ISN produz alterações permanentes dos circuitos intrínsecos ou eferentes da MCPAd, uma vez que os efeitos comportamentais foram observados

45 dias após o período de privação materna. Contudo, não foram encontradas diferenças entre os grupos controle e separado nem nos níveis de ansiedade, nem nos níveis de depressão avaliados nos testes do labirinto-em-cruz elevado (LCE) e natação forçada (NF), respectivamente. Embora estes resultados corroborem observações similares de outros pesquisadores (Lehmann e Feldon, 2000; Shalev e Kafkafi, 2002), outros estudos observaram a facilitação dos comportamentos de ansiedade e depressão (Eklund e Arborelius, 2006; Greisen et al., 2005). Os resultados contraditórios podem ter sido devidos à diversidade dos procedimentos de separação ou privação materna, não somente pelo modo da separação (isolamento de um único filhote ou de toda a ninhada), mas, principalmente, quanto à frequência e ao período pós-natal da separação materna (SM), ao controle da temperatura e à comunicação auditiva, visual ou olfativa com a mãe. De fato, além do tempo de contato entre mãe e filhote (Meaney, 2001), existem outros fatores que podem influenciar nos resultados. Por exemplo, dentre inúmeras combinações de variáveis em ordem crescente de complexidade (textura, temperatura dos filhotes, do ambiente ou da mãe, propriedades de objeto substitutivo da mãe, etc.), Hofer (1996) relatou que um pequeno “tapete” de pêlo sintético foi a única variável que, isoladamente, reduziu a vocalização dos filhotes privados. A variabilidade dos resultados também pode ter sido devida à diversidade dos modelos de avaliação de ansiedade experimental (Lehman e Feldon, 2000). Por sua vez, Suchecki et al. (1993a) relataram que um dos efeitos imediatos de um período único de privação materna de 24 h no SHRP é o aumento das concentrações basais e das repostas ao estresse de corticosterona (CORT) e corticotrofina (ACTH), sugerindo que o eixo HPA do filhote sofre uma inibição tônica da mãe. As consequências a longo prazo da ausência desta inibição dependem de uma série de fatores, em particular, da

idade do filhote e da duração da separação que parecem ter uma importância crítica.

Adicionalmente Suchecki et al. (1993b) demonstraram que a baixa atividade do eixo HPA durante o período inicial da vida é o resultado de fatores maternos combinados que preservam a hiporresponsividade. Mais notavelmente, fatores maternos independentes controlam aspectos distintos do eixo HPA. Assim, enquanto a alimentação suprime a secreção de CORT, mas não de ACTH, as carícias anogenitais inibem a secreção de ACTH sem interferir naquela de CORT. Aparentemente, portanto, enquanto a alimentação regula o amadurecimento das adrenais, a carícia anogenital regula o componente central do eixo HPA.

Fatores posteriores ao desmame também parecem influenciar o comportamento do animal adulto. Condições extremas, como isolamento social prolongado (alojamento individual) ou superlotação (aproximadamente 3 ratos/dm³), promoveram o desenvolvimento de traços ansiosos e depressivos, bem como facilitaram a resposta ao estresse na fase adulta (Brown e Grunberg, 1995; Maslova et al., 2010; Weintraub et al., 2010). Por outro lado, o enriquecimento do ambiente pelo alojamento em grupo, inserção de objetos variados e utilização de caixas maiores aumentou a interação social e tornou os animais mais resilientes no teste de natação forçada (Konkle *et al.*, 2010). Dados na literatura também revelam uma grande variação na forma do alojamento dos animais entre os laboratórios. Enquanto alguns laboratórios acondicionam os ratos em grupos de 4 a 5 animais por gaiola (Maslova et al., 2010), outros mantêm 2 a 3 ratos apenas (Galler e Seelig, 1981).

Conforme mencionado, estudos recentes sugerem que a exposição de ratos ao ISN tenha efeitos duradouros no controle respiratório (Montandon et al., 2008; Cayetanot et al., 2009; Kinkead et al., 2009). Estes estudos sugerem que enquanto as duas primeiras semanas parecem ser o período crítico no desenvolvimento do controle respiratório (Bavis e Mitchell, 2008), a simples mudança no padrão de alojamento dos animais de duplas para tríades bloqueou os efeitos respiratórios tardios do ISN (Fournier et al., 2013, 2011). De um ponto de vista mais abrangente, estes dados corroboram estudos clínicos que sugerem que a amamentação e o contato com a mãe reduzem os riscos de instabilidades respiratórias associadas não somente à prematuridade (Blaymore Bier et al., 1997; Ludington-Hoe et al., 1998; Parmar et al., 2009; Whitelaw et al., 1988) mas também ao TP (Klein, 1993).

3.5. Neuroplasticidade e desenvolvimento de psicopatologias

Os estudos acima sugerem que a produção, diferenciação e sobrevivência de neurônios são processos de alta plasticidade regulados por relações sociais e parenterais. Por exemplo, enquanto estressores físicos ou sociais reduziram a neurogênese mediante elevação dos níveis de CORT (Leuner e Gould, 2010; Schoenfeld e Gould, 2012), a exposição ao exercício físico moderado (Van Praag et al., 1999), o aprendizado (Epp et al., 2007; Gould et al., 1999; Leuner et al., 2004), a experiência sexual (Leuner et al., 2010), o ambiente enriquecido (Kempermann et al., 1997) e a auto-estimulação intracraniana (Takahashi et al., 2009) aumentaram a neurogênese no giro denteado do hipocampo (GD). Além do nível elevado de glicocorticóides, estas experiências também resultaram na produção de agentes

compensatórios que previnem os efeitos deletérios dos hormônios do estresse (Burgess et al. 1993; Droste et al. 2003; Mirescu & Gould 2006; Harrison et al. 2009; Waldherr et al. 2010). Embora esses agentes não tenham sido completamente explorados, um possível candidato é a ocitocina. Sua liberação em determinadas situações de recompensa pode ter um importante papel na proliferação neuronal no GD (Devries et al., 2003; Leuner et al., 2012; Ross e Young, 2009). Mais importante, as neurotrofinas, uma família de proteínas que regulam diversos aspectos do desenvolvimento e funções neuronais, incluindo plasticidade sináptica e formação de novas sinapses (CHAO, 2003), têm sido de extremo interesse, essencialmente no que tange a pesquisas envolvendo doenças neuropsiquiátricas. Os principais componentes da família, entre os mamíferos, são o fator de crescimento neuronal (NGF), o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), e as neurotrofinas NT3 e NT4/5. O BDNF, a neurotrofina mais abundante no SNC, parece estar envolvido nos transtornos de ansiedade (Jiang et al, 2005) e depressão unipolar (AYDEMIR et al, 2005, GONUL et al, 2005). Os efeitos do BDNF podem variar conforme a fase do desenvolvimento. No início da fase fetal, o BDNF é importante para a formação e maturação dos neurônios em geral. Na fase adulta, tem papel fundamental no processo de consolidação da memória episódica (POST, 2007). Tsankova et al. (2007) observaram que a regulação gênica do BDNF poderia ser alterada por fatores tais como estresse crônico. Em adição às variações genéticas, são também encontradas influências ambientais, sejam elas agudas ou crônicas, afetando os níveis cerebrais de BDNF. Em particular, Roceri et al. (2002) observaram que apenas um dia de privação materna em ratos resulta em diminuição nos níveis de BDNF no hipocampo. Adicionalmente o estresse prolongado resulta em déficits persistentes no hipocampo e regiões corticais.

A neurogênese em um cérebro maduro é uma forma excepcional de plasticidade na qual neurônios são produzidos em regiões específicas no cérebro de mamíferos (Ming e Song, 2011). As duas principais áreas onde ocorrem a neurogênese são a zona subventricular, que reveste os ventrículos cerebrais e dá origem às células precursoras de neurônios que migram para o bulbo olfativo e para a zona subgranular do hipocampo, na qual se originam as células granulares do GD (Ming e Song, 2011). A neurogênese é um processo lábil regulado por fatores ambientais. Assim, enquanto a neurogênese no hipocampo é estimulada por ambientes enriquecidos, aprendizagem e medicamentos antidepressivos, ela é inibida pelo estresse crônico e envelhecimento (David et al., 2010; van Praag et al., 2000; Warner-Schmidt e Duman, 2006). Dentre outros efeitos, os medicamentos antidepressivos estimulam a proliferação e diferenciação de neurônios jovens e promovem uma série de alterações estruturais que influenciam o funcionamento de neurônios já maduros (Sahay e Hen, 2007; Wang et al., 2008). Por outro lado, tanto o estresse agudo como crônico diminuem a proliferação e sobrevivência de neurônios em várias espécies, inclusive em primatas não-humanos (Schoenfeld e Gould, 2012; Vollmayr et al., 2007).

Alterações da neurogênese (bem como da apoptose) podem estar na base do desenvolvimento dos transtornos psiquiátricos. De fato, existem provas convincentes que experiências estressantes na infância, tais como negligência paterna, perda dos pais ou abuso físico ou sexual da criança, sejam fatores de risco importantes para o desenvolvimento da depressão na vida adulta (Cannetti et al., 1997; McCauley et al., 1997; Repetti et al., 2002; Heim e Nemeroff, 2001; Widom et al., 2007). Uma abordagem amplamente aceita sugere, portanto, que a combinação de fatores genéticos, experiências estressantes da infância e estresse por períodos

prolongados na vida adulta determinam a resposta do indivíduo a situações adversas e sua vulnerabilidade ao desenvolvimento de transtornos psiquiátricos, incluindo a depressão (Charney e Manji, 2004).

Em particular, a depressão é um dos transtornos mais incapacitantes da psiquiatria (Fava e Kendler, 2000; Kulkarni e Dhir, 2007). Pacientes com DM exibem perda de energia e interesse, anedonia, distúrbio do sono e apetite, sentimentos de culpa, dificuldade de concentração, retardo psicomotor, pensamentos recorrentes sobre a morte e, inclusive, tentativas freqüentes de suicídio (Austin et al., 2001; Tafet e Bernardini, 2003; Charney e Manji, 2004; Harvey et al., 2004; Dinan e Scott, 2005; Hihn et al., 2006; Kennedy, 2008). Um estudo da Organização Mundial de Saúde relatou que a depressão é a principal causa de incapacitação e a quarta causa na redução da vida produtiva do indivíduo, incluindo a morte prematura (Charney e Manji, 2004).

Por outro lado, vários estudos indicam a existência de uma forte correlação entre eventos traumáticos na infância e anormalidades comportamentais e neuroendócrinas na vida adulta (Kendler et al., 1992, Furukawa et al., 1999), tornando o indivíduo mais susceptível ao desenvolvimento de psicopatologias, incluindo a ansiedade, pânico e depressão.

Experimentos em ratos recém nascidos endossam a sensibilidade do sistema nervoso a alterações ambientais. O desenvolvimento de respostas adaptativas ao estresse pode ser modificado por eventos do período neonatal (Meaney et al., 1993; Faure et al., 2007). As evidências mostram que o comportamento da mãe e/ou intervenções que alteram a relação mãe-filhote resultam em alterações permanentes no sistema nervoso do filhote (Cirulli et al.,

1994; Giovenardi et al., 2000). Em particular, os estímulos tácteis, olfatórios e auditivos da mãe são os estímulos mais importantes no desenvolvimento do sistema nervoso dos filhotes (Caldji et al., 1998; Field et al., 1988; Gunnar, 2003; Kuhn e Schanberg, 1998; Newport et al., 2002). Assim, Levine (2001) mostrou que enquanto o eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HHA) dos ratos não responde aos estressores (injeção intraperitoneal de salina) nas duas primeiras semanas de vida, que ele denominou “período hiporresponsivo ao estresse” (SHRP, *stress hyporesponsive period*), o eixo torna-se responsivo se os filhotes forem submetidos à privação materna de 24 h durante este período. Levine (2001) também mostrou que as respostas ao estresse no SHRP são mínimas ou inexistentes devido aos estímulos maternos como o contato passivo, alimentação e estimulação anogenital.

Nesse sentido, a teoria do apego de John Bowlby (1973) sugere que o relacionamento afetoso, íntimo e próximo, da mãe ou figura materna, na primeira infância (1 a 3 anos de idade) favorece o desenvolvimento de uma personalidade saudável. Ao contrário, a ausência do cuidado materno resultaria em ansiedade de separação (*childhood separation anxiety*), levando ao desenvolvimento de apego ansioso (*anxious attachment*) e “personalidade insegura” no adulto (Bowlby, 1973; Bretherton, 1992), os quais seriam fatores predisponentes de psicopatologias, como fobia e pânico (Klein, 1964; Gittelman-Klein, 1995). Estas questões também estão no centro do conhecido debate sobre apego e dependência, segundo o qual o excesso de atenção materna impediria o amadurecimento da criança (Freud, 1905, 1917, 1926). Bowlby (1973) ressalta, no entanto, que o apego difere de dependência na medida que uma criança de 1 ano de idade é totalmente dependente da mãe mas ainda não desenvolveu o apego, enquanto uma criança de 5 anos já desenvolveu o apego embora seja praticamente independente da figura

materna. Em todo caso, não conhecemos nenhum modelo experimental de negligência materna no qual há a privação seletiva da atenção da mãe no momento especial em que o filhote isolado retorna à ninhada.

3.6. Efeitos do estresse de separação da infância na ansiedade, depressão e pânico dos ratos adultos

Estudos recentes em nosso laboratório (Quintino-dos-Santos et al., 2014) mostraram que os comportamentos similares ao pânico produzidos pela estimulação elétrica da MCPD estão facilitados em ratos adultos submetidos ao isolamento social neonatal (ISN), evidenciando a influência facilitatória do estresse na infância nos AP de indivíduos adultos. Contudo, não sabemos se a facilitação do pânico experimental foi devida à privação materna em si, ou ao excesso de cuidado materno (carícias anogenitais, lambidas, alimentação, transporte e limpeza do filhote) observado imediatamente após o retorno do filhote isolado ao ninho. Os efeitos facilitatórios no pânico experimental também podem ter sido devidos a uma interação do SM com o estresse pós-cirúrgico, e não ao SM em si. Em particular, Quintino-dos-Santos et al. (2014) empregou uma craniotomia extensa para exposição do seio venoso e um período curto de recuperação cirúrgica (5 a 7 dias) no qual os ratos foram alojados isoladamente. Assim, o presente estudo analisou os efeitos do período da SM e do cuidado materno no momento da reunião do filhote à mãe, sobre os níveis basais de ansiedade e depressão e sobre o pânico experimental de ratos adultos.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Examinar o efeito do período da SM e da presença ou ausência de cuidados maternos no momento da reunião do filhote isolado ao ninho sobre as respostas de ratos em modelos experimentais de ansiedade, depressão e pânico na vida adulta (60 dias de idade).

4.2. Objetivos Específicos

1. Analisar comportamento materno nos 5 min seguintes à reunião do filhote isolado à mãe.
2. Analisar a influência do cuidado materno no momento da reunião sobre respostas similares a ansiedade de ratos adultos expostos ao labirinto-em-cruz elevado (LCE) e campo-aberto (CA).
3. Analisar a influência do cuidado materno sobre os índices similares a depressão de ratos adultos submetidos à natação forçada (NF) e teste de consumo de sacarose (TCS).
4. Investigar a influência do cuidado materno sobre as intensidades limiares de exoftalmia, imobilidade, trote e galope, que constituem o modelo de pânico experimental produzido pela estimulação elétrica da MCPD em ratos adultos.

**5. EFEITOS DO PERÍODO DE SEPARAÇÃO MATERNA
E DO CUIDADO MATERNO NO MOMENTO DA
REUNIÃO DO FILHOTE À MÃE, NA ANSIEDADE,
PÂNICO E DEPRESSÃO NA VIDA ADULTA.**

INTRODUÇÃO

Os transtornos de ansiedade são uma das formas mais comuns de psicopatologia na juventude, com prevalência estimada entre 5% e 25% (Boyd et al., 2000; Costello et al., 2003; Essau et al., 2000; Roza et al., 2003; Wittchen et al., 1998). Dentre estes, a ansiedade de separação na infância (ASI) é o mais freqüente na fase precoce da vida, sendo responsável por quase 50% dos tratamentos de transtornos de ansiedade em pré-adolescentes (Bell-Dolan, 1995; Cartwright-Hatton et al., 2006). A ASI é um transtorno no qual a separação da criança em relação à figura de apego é acompanhada de ansiedade excessiva (APA, 2000). A síndrome foi descrita como um conjunto de sintomas e comportamentos da criança que refletem a ativação de um sistema de alarme de rupturas reais, ou potenciais, dos laços familiares (Bowlby, 1983; Klein, 1995).

Por outro lado, Donald Klein (1993) propôs que o transtorno de pânico (TP) seja causado pelo disparo falso de um sistema de alarme de sufocamento. Klein (1993a) argumenta que a teoria do 'alarme falso de sufocamento' (AFS) é uma explicação suficiente e consistente da hipersensibilidade dos pacientes com diagnóstico de pânico ao dióxido de carbono (CO_2) e lactato de sódio (LAC), da ocorrência de ataques de pânico durante as condições hipercápnicas do relaxamento e sono. Adicionalmente, Klein (1993) propôs que a teoria é compatível com a redução da incidência de ataques de pânico durante a gravidez, parto e lactação e, inversamente com o aumento da freqüência de pânico na doença disfórica de fase lútea tardia (síndrome pré-menstrual), nos quais a respiração é aumentada ou reduzida por mudanças paralelas da secreção de progesterona, respectivamente. A hipótese do AFS também é

consistente com alta comorbidade de doenças respiratórias presentes e antecedente com pânico (Shavitt *et al.*, 1992; Preter and Klein, 2008). O TP acomete 2% a 5% na população em geral, mas pode apresentar incidência de até 13% em jovens adultos (20 a 30 anos), com graves limitações do desempenho social e familiar do indivíduo, principalmente, se acompanhado por agorafobia (Goodwin e Barr, 2005). Nestes casos, é interessante notar que os pacientes não temem locais públicos em geral, mas locais nos quais podem ficar desamparados na eventualidade de um AP.

Vários estudos sugerem que a ASI favoreça o TP. Em particular, os estudos pioneiros de Klein (1964) relataram que metade dos pacientes hospitalizados com agorafobia havia sofrido de ASI tão grave que, freqüentemente, impediu-os de comparecer à escola. Estes dados levaram Klein (1964) a formular a hipótese de que a ASI favorece o TP na vida adulta (Biederman *et al.*, 2005; Kagan *et al.*, 1988; Silove e Manicavasagar, 1993). Mais notavelmente, a “hipótese da ansiedade de separação” foi confirmada por Rachel Klein (1995) num estudo longitudinal ao longo de 15 anos, duplo-cego, baseado em entrevistas clínicas de 60 controles e 54 pré-adolescentes com grave recusa escolar. Esta autora mostrou que o aumento na incidência de AP foi a única condição psiquiátrica estatisticamente significativa nos adultos que haviam sofrido de ASI (7% versus 0%, $P<0,05$). Adicionalmente, houve uma tendência mais elevada ($P<0,10$) para o desenvolvimento de depressão e um aumento estatisticamente significativo de hospitalizações dos probandos devidas, principalmente, a episódios depressivos (14% versus 1,7%, $P<0,02$). A hipótese da ansiedade de separação também foi apoiada pela eficácia comprovada da imipramina tanto no TP quanto na ASI (Bernstein *et al.*, 2000;

Gittelman-Klein e Klein, 1973). Estas observações, juntamente com a teoria de apego de Bowlby (1973) impulsionaram o desenvolvimento da classificação contemporânea dos transtornos de ansiedade (APA, 2000).

A influência da ASI na etiologia dos transtornos de ansiedade foi corroborada em estudos pré-clínicos que mostraram que ratos isolados da mãe, um modelo de ASI, apresentam ansiedade e depressão na idade adulta. (Plotsky e Meaney, 2001; Huot et al., 2001; Pryce e Feldon, 2003; Lee et al., 2007; Aisa et al., 2008; Marais et al., 2008; Lambás-Señas et al., 2009). Efeitos similares foram observados em ratos que foram reunidos a mães “negligentes” (Meaney, 2010). Em particular, Kinkead e colaboradores mostraram que ratos adultos que foram submetidos ao ISN apresentaram uma facilitação sexo-dependente das respostas respiratórias à hipóxia (machos) e à hipercapnia (fêmeas) (Dumont e Kinkead, 2010; Genest et al., 2004, 2007a,b).

Embora o substrato neural responsável pela gênese dos AP permaneça incerto, estimulações elétricas ou químicas da matéria cinzenta periaquedutal dorsal (MCPAd) evocam emoções aversivas em humanos (Nashold et al., 1969) e respostas comportamentais e viscerais em animais (Bittencourt et al., 2004) que se assemelham aos AP. Conseqüentemente, as respostas eliciadas pela estimulação da MCPAd têm sido propostas como um modelo experimental de AP (Deakin e Graeff, 1991; Gentil, 1988; Jenck et al., 1995; Schenberg, 2010; Schenberg et al., 2001, 2014; Schimitel et al., 2012).

Recentemente, Quintino-dos-Santos et al. (2014) mostraram que ratos adultos submetidos ao ISN por 3 h diárias ao longo do período de amamentação (21 dias) apresentaram reduções acentuadas dos limiares dos

comportamentos de defesa para as respostas de imobilidade, exoftalmia, trote, galope e salto eliciados por estimulação elétrica da MCPAd de ratos adultos (60 dias de idade). Este estudo é a primeira evidência em animais da influência facilitatória do estresse de separação na infância no pânico experimental de ratos adultos. Adicionalmente, estes dados sugerem que o ISN produza alterações permanentes nos circuitos intrínsecos ou eferentes da MCPAd, fornecendo informações valiosas sobre os mecanismos neurais da comorbidade do TP e ASI.

Contudo, os resultados de Quintino-dos-Santos et al. (2014) não deixaram claro se a facilitação do pânico experimental foi devida à privação materna em si, ou ao excesso de carícias maternas após a reunião do filhote isolado à mãe. Portanto, o presente estudo analisou os efeitos do cuidado materno no momento da reunião do filhote isolado à mãe sobre a ansiedade, depressão e pânico na idade adulta.

MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos foram aprovados pelo comitê de ética no uso de animais para pesquisa científica da Universidade Federal do Espírito Santo (CEUA-UFES Protocolo 032/2013).

Animais

Ratas Wistar nulíparas (n=28), pesando 220-250g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências da Saúde da UFES, foram mantidas a $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ numa sala com atenuação sonora e ciclo claro/escuro de 12 h (luzes acesas às 6:00 h). As ratas eram alojadas em caixas-viveiro de polietileno (49 x 34 x 16 cm) com assoalho coberto com maravalha e água e comida ad libitum. Cada caixa-viveiro tinha 2 a 4 fêmeas e 1 macho para cruzamento. As caixas-viveiro eram limpas 2 vezes por semana tomando-se o cuidado de confirmar a presença de gravidez. Cerca de 10 a 15 dias após o cruzamento, as fêmeas gestantes eram alojadas individualmente em caixas-ninho (30 cm x 20cm x 25cm) que tinham o assoalho coberto por maravalha e água e comida ad libitum. No 1º dia pós-natal (PN1) os filhotes fêmeas eram sacrificados e as mães e os filhotes machos eram mantidos nas caixas-ninho até o desmame (PN21). Após este período as mães eram sacrificadas e os filhotes foram criados isoladamente em caixas-ninho até a idade adulta.

Separação materna

Dos 104 filhotes utilizados, 42 foram submetidos a 3 h diárias de SM entre PN2 e PN21 (SM-20), 42 foram submetidos a 3 h diárias de SM entre PN4 e PN14 (SM-11) e 20 foram submetidos a 3 h diárias de separação materna fictícia (SMF).

A SM era realizada entre 13:00 às 16:00 h, colocando-se todos os filhotes de uma prole numa 'caixas de separação' individual (30 cm x 20 cm x 13 cm). Em duas proles, de filhotes submetidos a separação materna por 20 dias, reunidos a uma mãe consciente, somente metade dos filhotes foi

separada, os quais eram identificados com uma marca no dorso feita com uma caneta cirúrgica. A comunicação mãe-filhote foi reduzida alojando-se as caixas de separação numa estufa à temperatura ambiente numa sala distinta da mãe e/ou dos filhotes não-isolados. Ao término das sessões de separação, os filhotes retornavam à caixa-ninho.

Na SMF os filhotes eram manipulados de forma similar àquela dos filhotes submetidos à SM, mas eram devolvidos às mães imediatamente. Dos filhotes submetidos à SM, 42 foram reunidos a mães conscientes (MC) e 42 a mães anestesiadas (MA) com hidrato de cloral 20 min antes da reunião com os filhotes isolados.

No momento da reunião, o comportamento das MC em relação aos filhotes, separados ou controles, foi filmado por 5 min, no mesmo horário, e analisado *off-line*.

Após o desmame em PN21, os ratos foram alojados em gaiolas individuais (30 cm x 21 cm x 35 cm) com água e comida *ad libitum* e assoalho coberto por maravalha, numa sala com atenuação sonora e condições controladas de temperatura (21-22°C) e luminosidade (ciclo claro-escuro de 12 h, luzes acesas às 6:00 h). Em PN52, os animais eram submetidos à cirurgia de implantação de eletrodo na MPCD e, 7 dias após, estimulados eletricamente.

Eletrodos

Os eletrodos eram confeccionados com um fio de aço inoxidável de 250 µm de diâmetro (Califórnia Fine Wire Company, Grover City, CA, EUA)

isolado em toda extensão exceto na seção transversal de sua extremidade livre. Um fio não-isolado de aço inoxidável serviu de eletrodo indiferente. Os eletrodos eram soldados a um soquete de circuito integrado (BCPT 50, Cromatek, Guarulhos, Brasil).

Cirurgia

Em PN52, os ratos eram anestesiados com cetamina (1.0 mL/kg, I.P) e xilazina (0.5 mL/kg, I.P.) (Vetbrands, Jacareí, SP, Brasil), tratados com ceftriaxona sódica (30 mg/kg, I.M.) e diclofenaco sódico (1 mg/kg, I.M.), fixados ao aparelho estereotáxico (David Kopf, Tujunga, EUA) e cobertos com uma manta para evitar a perda de calor. O peso era registrado para análise posterior. Em seguida, fazia-se a assepsia da parte superior da cabeça com álcool 70° e solução de iodo e removia-se uma pequena área oval da pele e tecidos subcutâneos, expondo-se o crânio do bregma ao lâmbda. Após a incisão e raspagem da gálea aponeurótica, eram feitos quatro orifícios (2 nos ossos parietais e 2 no osso interparietal) com o auxílio de uma broca odontológica, nos quais eram introduzidos pequenos parafusos de aço inoxidável para ancoragem da prótese. A seguir, realizava-se um orifício -2.1 mm lateralmente e -7.8 mm posteriormente ao bregma para introdução de um eletrodo dirigido à MCPAd num ângulo de 15°, 5 mm abaixo da superfície óssea. Após a soldagem do eletrodo indiferente a um parafuso de fixação e a limpeza e secagem da calota craniana, o campo cirúrgico era preenchido com resina acrílica autopolimerizável e os ratos eram colocados numa placa térmica (32°C) até se recuperarem da anestesia.



Figura 3. Rato sete dias após a cirurgia de implantação dos eletrodos intracranianos.

Estimulação intracraniana

Os ratos foram estimulados intracranialmente em PN59 (n=106). Uma sessão de triagem era realizada sete dias após a cirurgia de implantação, selecionando-se os animais que apresentavam resposta de galope em intensidades inferiores a 70 μA (n=66) para padronização. Para isto, os animais eram colocados numa arena circular de acrílico transparente, com 60 cm de altura e diâmetro e, dez minutos após, estimulados com pulsos senoidais de intensidade crescente em passos de 5 μA (microampere) (60 Hz, c.a., 30 s, 0-90 μA , pico-a-pico) gerados por um estimulador de corrente constante (FDV, Ribeirão Preto, SP, Brasil). Os estímulos eram aplicados por meio de um cabo flexível acoplado a um conector giratório de mercúrio. As intensidades de corrente eram monitoradas por meio de um osciloscópio (V-212-HITACHI,

Malásia). Os estímulos eram aplicados em intervalos de 30-90 segundos até a obtenção da resposta de fuga (galope e/ou saltos). As sessões eram realizadas numa sala com atenuação acústica e temperatura de 25 °C.

Registros comportamentais à estimulação intracraniana

Os registros comportamentais eram realizados de forma binária, ou seja, registrando-se a ocorrência ou não dos itens comportamentais durante os períodos de estimulação, independentemente de sua frequência ou duração durante a estimulação. A observação comportamental dos animais foi feita com o auxílio do etograma que se segue:

Dormir - Postura horizontal com olhos fechados, sem atividade olfativa, e com relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco, cabeça e pescoço e pela flexão dos membros.

Repouso - Postura horizontal com olhos semi-abertos ou abertos, atividade olfativa reduzida e relaxamento muscular indicado pelo rebaixamento do tronco e pela flexão dos membros. O rato pode apresentar uma postura de “esfinge”, com o tronco rebaixado e pescoço e cabeça erguidos.

Autolimpeza - Manipulação repetitiva dos pêlos da cabeça, tronco e genitais usando as patas dianteiras ou a boca (comportamentos autodirigidos). A manipulação dos pêlos com as patas posteriores (coçar) foi incluída neste item.

Olfacção - Exploração olfativa do ambiente indicada pelo movimento das narinas e das vibrissas e movimentos pendulares da cabeça em posição elevada.

Esquadrinhar - Exploração visuomotora do ambiente caracterizada por movimentos laterais da cabeça, geralmente, acompanhados de olfacção.

Levantar - Postura ereta, com extensão das patas posteriores.

Marcha - Locomoção lenta do animal por, pelo menos, dois espaços do assoalho da arena, mediante a projeção simultânea das patas contralaterais anterior e posterior.

Mistacioplegia - Paralisia das vibrissas

Imobilidade tensa - Cessar brusco de todos os movimentos, freqüentemente acompanhado de extensão dos membros (elevação do tronco), orelhas e pescoço e, às vezes, da cauda, indicando o aumento do tônus muscular. O cessar brusco das atividades pode resultar em posturas anômalas.

Trote - Locomoção rápida do animal, mantendo o padrão contralateral da marcha.

Galope - Deslocamento rápido com a projeção alternada dos pares de patas dianteiras e traseiras.

Saltos - Impulsos verticais, freqüentemente em direção à borda superior da arena.

Exoftalmia - Abertura máxima das pálpebras (contração do músculo tarso palpebral) e protrusão do globo ocular (contração do músculo orbital), o qual assume aspecto esférico e cor brilhante indicativa de uma maior entrada de luz. Estas respostas resultam no aumento do campo visual e apresentam um sinergismo evidente com a midríase, também de natureza simpática, que ocorre durante a reação de defesa natural ou induzida por estimulação intracraniana.

Defecação e Micção - Eliminação de fezes e urina.

Somente as respostas defensivas, quais sejam, exoftalmia, imobilidade, trote, galope e salto foram analisadas no presente estudo. De acordo com o etograma, a “reação de congelamento” (*freezing behavior*) compreende as respostas de imobilidade tensa acompanhada de exoftalmia e, eventualmente, defecação e micção. A reação de fuga (*flight behavior*) compreende as respostas de trote, galope e salto, que são igualmente acompanhadas de exoftalmia (Schenberg et al., 2001; Vargas et al., 2000).

Teste de consumo de sacarose (TCS)

Este teste foi realizado nos dias PN59-63. Foram avaliadas a ingestão total de água ou de solução de sacarose (1%) e a frequência do comportamento de beber. Em PN59 os ratos eram privados de água e alimento. Em PN60 era expostos a uma solução de sacarose (1%) e, em PN61, a garrafas idênticas, previamente pesadas, com água ou solução de sacarose. Os recipientes eram colocados nas caixas-viveiro e os ratos eram filmados por 1 h, invertendo-se a posição dos recipientes após 30 min de filmagem para

reduzir eventuais preferências de posicionamento das garrafas. Após 48 h, as soluções eram pesadas novamente (peso final), calculando-se o volume ingerido. O comportamento de beber foi calculado *off-line pela* análise dos filmes, registrando-se o número de períodos ininterruptos de beber. Para cada animal foi calculada média dos 3 dias do TCS.

Teste do campo aberto (CA)

O teste do campo aberto (CA) foi realizado em PN67. O rato era colocado na periferia de um campo aberto com 1m de aresta. O assoalho era dividido em 49 quadrados de 15 cm, dos quais nove compunham a região central e 40 compunham a região periférica. Os testes foram realizados numa sala com luminosidade de 44 lux e filmados com uma câmara digital SONY (Modelo CM-910). O rato era filmado por cinco minutos e os comportamentos de defecação (número de bolos fecais), locomoção periférica (peritaxia) e central (centrotaxia) foram quantificados *off-line* pela análise dos filmes.

Teste do labirinto-em-cruz elevado (LCE)

O LCE baseia-se na aversão natural dos roedores aos espaços abertos. O equipamento é feito de madeira com revestimento de fórmica e situa-se a 70 cm do assoalho. O LCE é formado por quatro braços perpendiculares de 50 cm de comprimento e 10 cm de largura, dos quais 2 braços opostos apresentam paredes de 40 cm de altura (braços fechados) e os outros 2 uma borda de apenas 1 cm de altura (braços abertos). Os braços comunicam-se por uma plataforma central (10 x10 cm).

Em PN68 o rato era colocado na plataforma central, voltado para o braço fechado, e sua atividade era filmada por cinco minutos. Os filmes foram analisados *off-line* registrando-se os tempos de exploração no braço aberto (TBA) e braço fechado (TBF), o tempo despendido na plataforma central (TPC) e o número de entradas nos braços abertos (EBA) e braços fechados (EBF). As porcentagens de entradas (%EBA) e tempo (%TBA) nos braços abertos foram

calculadas como $EBA/(EBA+EBF) \times 100$ e $TBA/(TBA+TBF) \times 100$, respectivamente. Os testes foram realizados numa sala com iluminação de 44 lux e filmados com uma câmara digital SONY (Modelo CM-910).

Teste da natação forçada (NF)

A NF foi realizada em PN74 e PN75, num cilindro de aço inoxidável de 24,5 cm de diâmetro por 67cm de altura, com uma coluna d'água de 54 cm. Na sessão pré-teste os ratos eram colocados no cilindro por 15 min. No dia seguinte, eles eram filmados com uma câmara digital SONY (Modelo CM-910) durante cinco minutos. O comportamento de natação foi definido como o nado propriamente dito e mergulhos ou tentativas de escalar as paredes do cilindro. O tempo de imobilidade foi registrado para os períodos em que o rato permanecia virtualmente imóvel (boiando), apresentando apenas pequenos movimentos para manter a cabeça fora d'água.

Histologia

Ao término dos experimentos os ratos eram anestesiados com 120 mg/kg (I.P.) de tiopental sódico (Cristália, SP, Brasil), fixados a uma plataforma de perfusão e submetidos a uma toracotomia. Em seguida, clampeava-se a aorta descendente e puncionava-se o ventrículo esquerdo, seccionando-se a aurícula para dar vazão às soluções de perfusão (salina e aldeído fórmico 10%, 200 mL cada), as quais eram injetadas com o auxílio de uma bomba de perfusão (Masterflex CL, Barrington, EUA). Após a perfusão, os ratos eram

decapitados e as cabeças permaneciam pelo menos 3 dias numa solução de aldeído fórmico 10 %. A seguir, os cérebros eram removidos e dissecados para a preparação do tronco encefálico. Os blocos eram posicionados em um criostato (Leica CM1850, Wetzlar, Germany) e seccionados em cortes de 40 µm de espessura. Os cortes eram então estendidos em lâminas gelatinizadas, desidratados, corados com vermelho neutro (Sigma, EUA) e montados com DPX (Aldrich Chemical Company, EUA). Os sítios das estimulações foram identificados, fotografados por microscopia de baixo aumento (Leica DM2500 acoplado a uma câmera DFC 300 FX, Wetzlar, Germany), e registrados em diagramas coronais do encéfalo do rato do atlas de Paxinos e Watson (1998).

Estatística

Análise do comportamento das mães

O comportamento das mães em relação aos filhotes (carícias e transporte) no momento da reunião (16:00 h) foi quantificado para 7 proles do grupo SM-20, 4 proles do grupo SM-11, e 2 proles do grupo SMF (controles não-separados), totalizando 13 mães e 64 filhotes. Para isto, o tempo total despendido em carícias anogenitais ou transporte foi dividido pelo número de filhotes da prole, fornecendo o tempo médio dedicado a cada filhote. Assim, cada prole contribuiu com apenas um dado para a análise estatística. Em que pese o número pequeno de proles controles (n=2), as séries temporais completas para os 3 grupos (PN4-PN14) foram submetidas à análise de variância (ANOVA) para medidas repetidas seguida de contrastes lineares

tanto longitudinais, em relação aos valores de PN4, quanto transversais, em relação aos controles não separados. Como os dias PN2 e PN3 não foram incluídos na ANOVA para medidas repetidas, o comportamento das mães dos grupos controle e SM-20 destes dias foi comparado por testes-t para amostras independentes. Devido à heterogeneidade das variâncias, os níveis de significância correspondem à correção de Greenhouse-Geisser.

Análise do comportamento dos ratos adultos submetidos à SM

Todos animais do estudo (n=106) foram submetidos a cirurgia de implantação de eletrodo na MCPA estimulação intracraniana, LCE, CA, TA e NF. Dois ratos que apresentaram valores extremos (*outliers*) no LCE foram excluídos por meio de análise do resíduo normal máximo (*maximum normed residual*) (Snedecor e Cochran, 1980). Os dados restantes do LCE, CA, TA, NF, estimulação intracraniana e peso final foram submetidos à ANOVA de uma via ou duas vias, para comparação dos grupos experimentais com o grupo controle ou para avaliação da contribuição isolada e interações do período de privação e cuidado materno, respectivamente.

As diferenças foram consideradas significantes para o nível descritivo de 5% de Bonferroni. Os resultados foram apresentados como valores médios (\pm EPM). Todos os procedimentos estatísticos foram realizados por meio do programa Statistical Analysis Systems (SAS®, Cary, North Carolina).

RESULTADOS

Comportamento das mães de proles isoladas e não-isoladas

No período e horário (5 min entre 13:00-16:00 h) utilizados, as carícias anogenitais foram virtualmente ausentes nos grupos SMF e SM-11. Nestas condições de observação, somente foram observadas carícias anogenitais após PN5 no grupo SM-20. A frequência reduzida das carícias anogenitais pode ser devida ao período e horário da observação.

Em contraste, o comportamento de carrear apresentou um declínio progressivo ($F_{1,100} = 4,1$; $P < 0,02$) ao longo do período submetido à ANOVA de medidas repetidas (PN4-PN14), sendo virtualmente abolido após PN17 (Fig.4). Contudo, o comportamento de transporte foi mais intenso nos dias PN2 e PN3, nos quais as mães dedicaram-se quase que exclusivamente aos filhotes separados (Fig.4). Este comportamento explica a ausência de transporte dos filhotes não-separados nestes dias (Fig.4). Apesar do número pequeno de proles do grupo SMF ($n=2$), a duração média do transporte no grupo SM-20 foi marginalmente maior em PN3 ($t_7=2,11$; $P < 0,07$). Adicionalmente, os contrastes lineares entre os grupos SMF e SM-11 mostraram reduções significativas do comportamento de carrear no primeiro grupo nos dias PN5 e PN6.

Efeitos da separação materna e cuidado materno no desempenho no LCE

Não foram observadas diferenças significantes entre os grupos para nenhuma das variáveis do LCE (Fig.5).

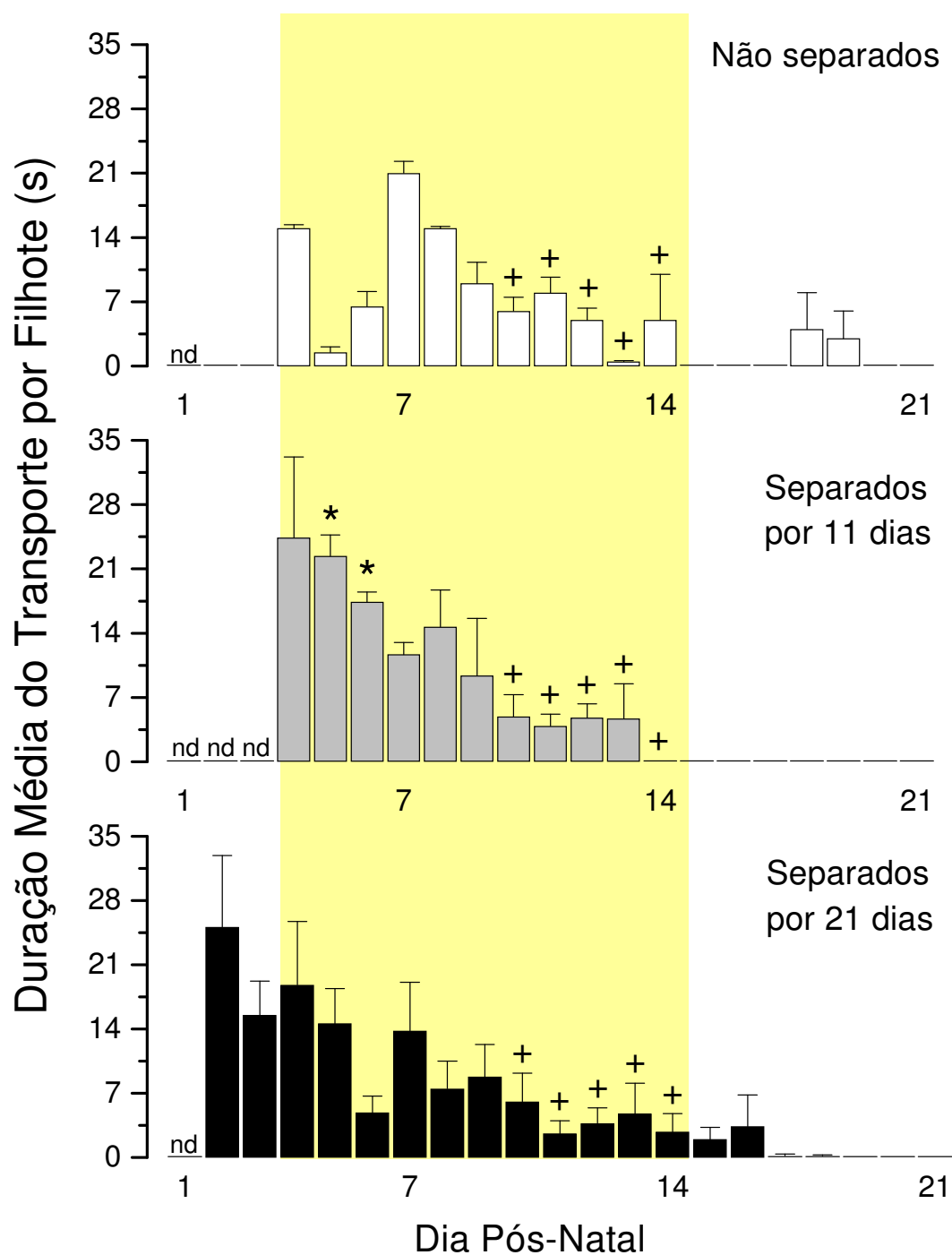


Figura 4. Duração média (\pm EPM) do transporte dos filhotes não-isolados ou isolados por 3 h diárias por 11 ou 20 dias pós-natais. Os valores referem-se aos 5 min após a reunião dos filhotes isolados ou período e horário equivalentes dos filhotes não isolados. Filhotes isolados e não-isolados de uma mesma prole foram alocados aos gráficos respectivos. O fundo amarelo indica o período com séries completas que foi submetido à ANOVA para medidas repetidas. * $P < 0,05$, diferente do respectivo dia do grupo SMF, + $P < 0,05$, diferente de PN4. nd – dados não disponíveis.

Efeitos da SM e cuidado materno sobre o desempenho no CA

Não houve diferença significativa entre grupos para a porcentagem da atividade exploratória das regiões central e periférica (Fig.6). Em contraste, o número de bolos fecais apresentou diferenças altamente significantes ($F_{3,75}= 3,94$; $P<0,01$). Essas diferenças foram devidas unicamente ao cuidado materno ($F_{1,75}= 9,55$; $P<0,005$), havendo uma redução significativa dos bolos fecais dos filhotes das mães anestesiadas tanto no grupo SM-11 ($t=2,5$; $P<0,01$) quanto no grupo SM-20 ($t=3,24$; $P<0,005$).

Efeitos da SM e cuidado materno sobre o desempenho dos ratos na NF

A ANOVA de uma via detectou diferenças altamente significantes entre grupos na porcentagem do tempo de natação ($F_{4,91}= 8,37$; $P<0,0001$) (Fig.7). Comparados ao grupo controle, o tempo de natação foi marcadamente aumentado no grupo MC/20D ($t=3,79$; $P<0,0005$), enquanto foi marginalmente reduzido no grupo MA/11D ($P<0,05$). Também foram observados aumentos significantes do tempo de natação nos grupos MA/11D ($t=3,61$; $P<0,0005$) e MC/20D ($t=2,52$; $P<0,01$) em relação ao grupo MC/11D.

Também foram observadas diferenças altamente significantes do tempo de natação na ANOVA de duas vias dos grupos isolados ($F_{3,73}= 9,87$; $P<0,0001$). Essas diferenças foram devidas tanto ao período de separação ($F_{1,73}= 8,89$; $P<0,005$) quanto, de forma ainda mais pronunciada, à interação entre período e cuidado materno ($F_{1,73}= 20,03$; $P<0,0001$).

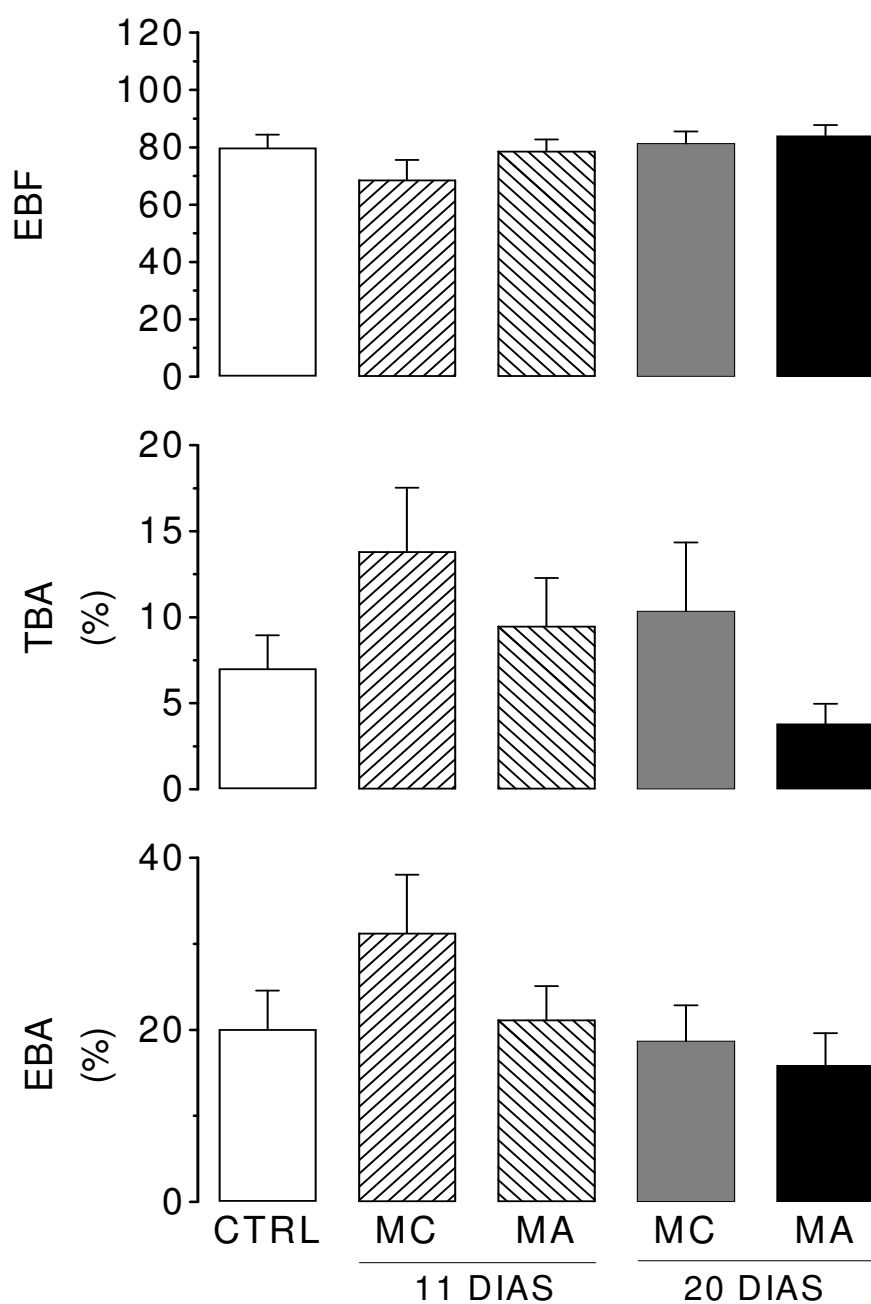


Figura 5. Efeitos da separação materna no teste do labirinto-em-cruz elevado em ratos adultos submetidos à separação materna fictícia (controles) ou à separação materna ao longo dos dias pós-natais PN4-PN14 (11 dias) ou PN2-PN21 (20 dias). Abreviaturas: EBF - entradas no braço fechado, %EBA - porcentagem de entradas no braço aberto, %TBA - porcentagem de tempo no braço aberto, CTRL – controles, MC e MA – mães conscientes ou anestesiadas no momento da reunião do filhote separado.

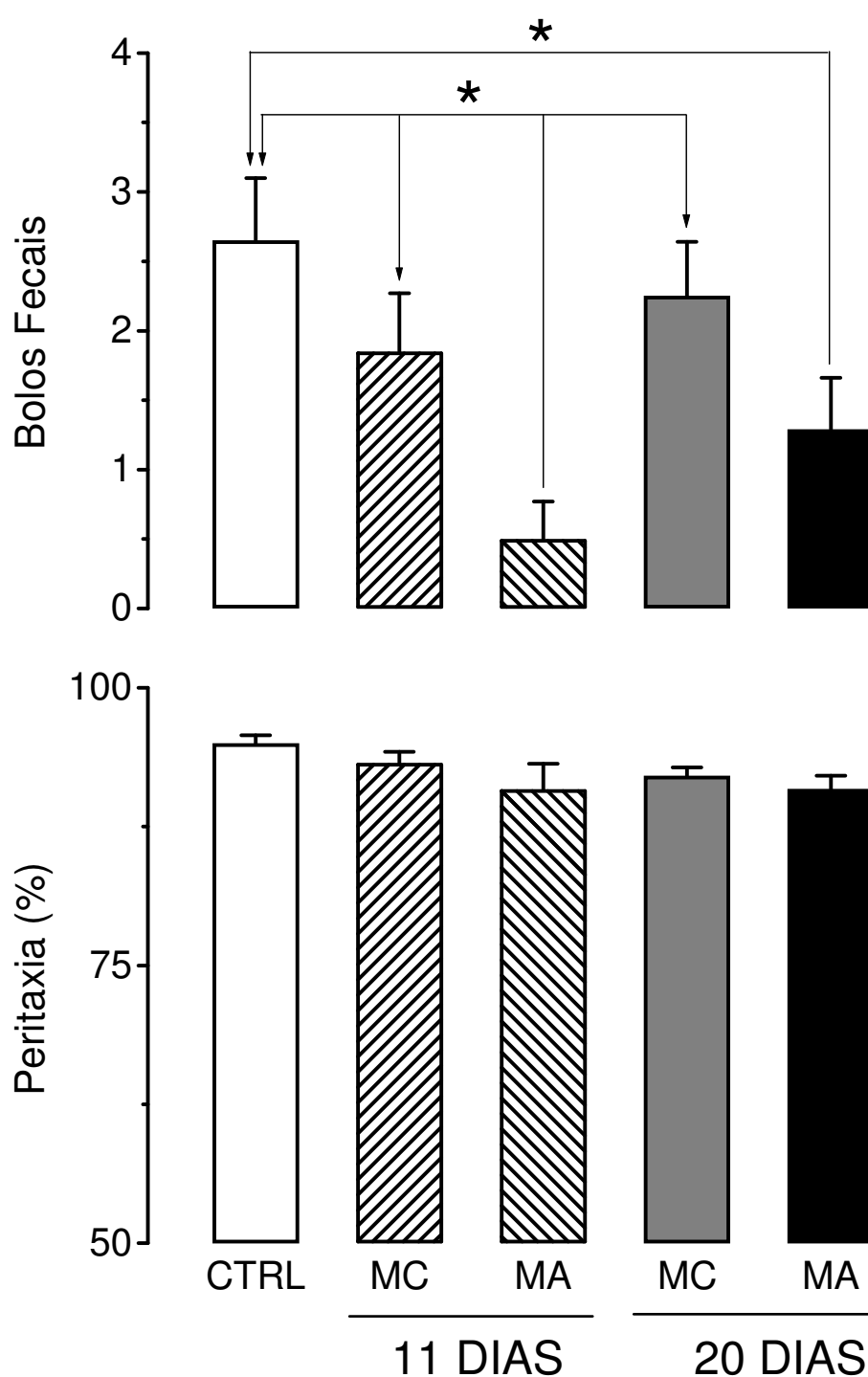


Figura 6. Efeitos da separação materna no teste do campo aberto em ratos adultos submetidos a separação materna fictícia (controles) ou à separação materna ao longo dos dias pós-natais PN4-PN14 (11 dias) ou PN2-PN21 (20 dias). * $P < 0,05$, diferença significativa dos grupos assinalados em relação aos grupos indicados pelas setas (ANOVA de 1 via seguida por testes *post hoc* de Bonferroni). Demais detalhes como na Fig.5.

Efeitos da SM e do cuidado materno no TA em ratos adultos

A ANOVA de uma via dos grupos SMF e SM mostrou diferenças significantes tanto em relação ao consumo ($F_{4,100} = 5,26$; $P < 0,001$) quanto à frequência de lambidas ($F_{4,99} = 3,29$; $P < 0,01$) da solução de sacarose (Fig.8). Em particular, a frequência de lambidas do grupo MC/20D foi maior que aquela dos grupos MC/11 ($t = 2,86$; $P < 0,005$), MA/11 ($t = 2,88$; $P < 0,01$) e MA/20 ($t = 3,6$; $P < 0,005$). Embora a frequência de lambidas do grupo MC/20D também tenha sido maior que aquela dos controles submetidos à SM, esta diferença não alcançou significância estatística ($P < 0,12$). Os efeitos sobre o consumo foram menos seletivos, observando-se aumentos similares nos grupos MA/11, MC/20 e MA/20 em relação aos grupos SMF e MC/11 (Fig.8).

A ANOVA de duas vias dos grupos submetidos à SM também detectou diferenças significantes tanto no consumo ($F_{3,81} = 4,11$; $P < 0,01$) como na frequência de lambidas ($F_{3,80} = 4,73$; $P < 0,005$) da solução de sacarose. Contudo, enquanto as diferenças no consumo foram devidas ao período da separação ($F_{1,81} = 4,49$; $P < 0,05$) e cuidado materno ($F_{1,81} = 6,21$; $P < 0,01$), exclusivamente, as diferenças na frequência foram devidas tanto ao período ($F_{1,80} = 4,42$; $P < 0,05$) quanto à interação deste com o cuidado materno ($F_{1,80} = 5,85$; $P < 0,05$), e apenas marginalmente ao cuidado materno isoladamente ($F_{1,80} = 3,49$; $P < 0,06$).

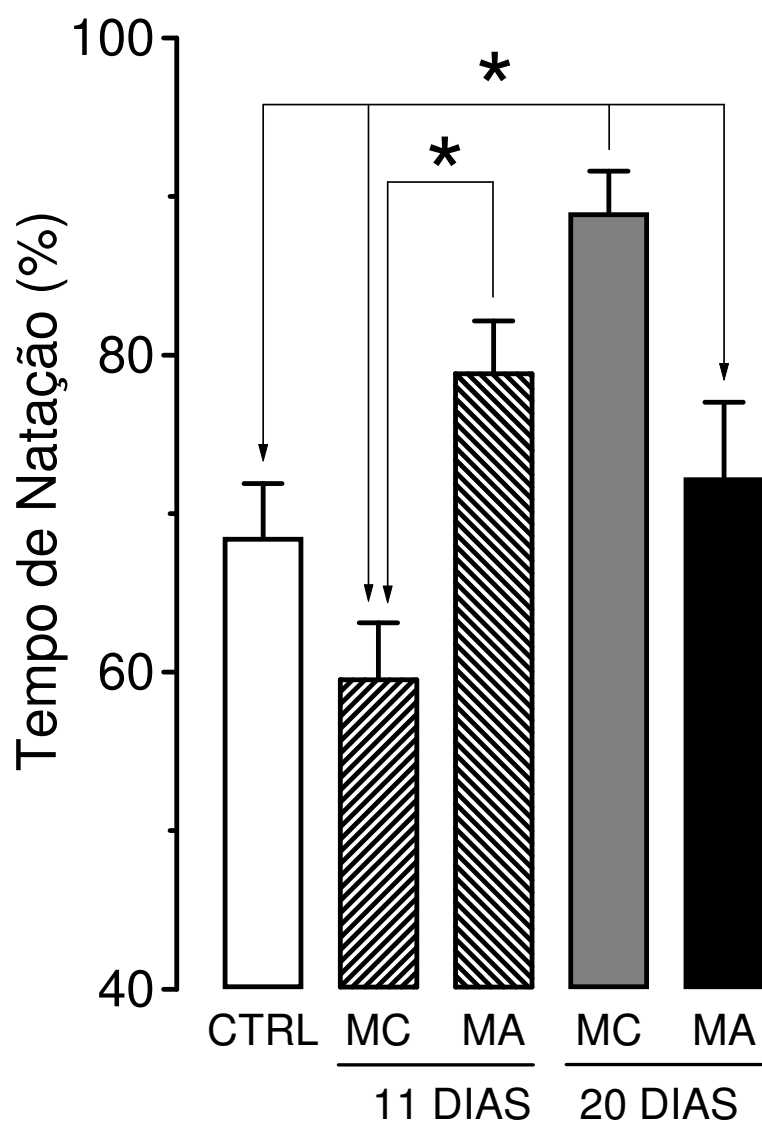


Figura 7. Efeitos da separação materna e do cuidado materno no teste da natação forçada em ratos adultos submetidos à separação materna fictícia (controles) ou à separação materna ao longo dos dias pós-natais PN4-PN14 (11 dias) ou PN2-PN21 (20 dias). * $P < 0,05$, diferenças significantes do grupo assinalado em relação aos grupos indicados pelas setas (ANOVA de 1 via seguida por testes *post hoc* de Bonferroni). O grupo MC/11 diferiu marginalmente do grupo controle. Demais detalhes como na Fig.5.

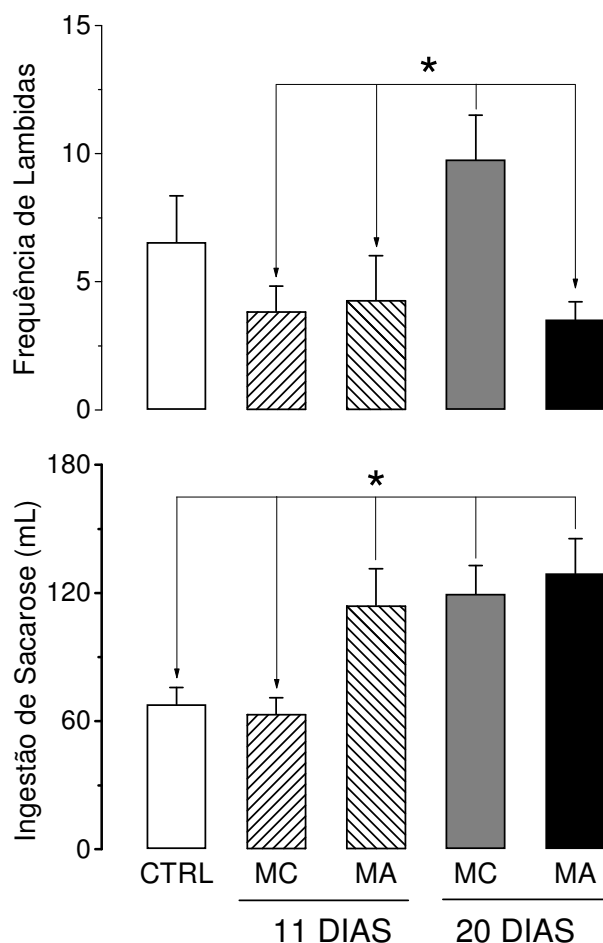


Figura 8. Efeitos da separação materna e do cuidado materno na frequência de lambidas (gráfico superior) e no consumo (gráfico inferior) de uma solução de sacarose (1%) em ratos adultos que foram submetidos à separação materna fictícia (controles) ou à separação materna entre PN4-PN14 (11 dias) ou PN2-PN21 (20 dias). * $P < 0,05$, diferença significativa dos grupos assinalados em relação aos grupos indicados pelas setas (ANOVA de 1 via seguida por testes *post hoc* de Bonferroni). Demais detalhes como na Fig.5.

Efeitos do cuidado materno e da separação materna sobre o peso dos ratos

Os grupos também diferiram marcadamente quanto aos pesos em PN60 ($F_{4,99} = 4,54$; $P < 0.005$) (Fig.9). A ANOVA de duas vias dos grupos

isolados mostrou que essas diferenças foram devidas tanto ao cuidado materno ($F_{1,80} = 6.07$; $P < 0.05$) quanto ao período da separação materna ($F_{1,80} = 5.07$; $P < 0.05$) e à interação destes fatores ($F_{1,80} = 4.69$; $P < 0.05$).

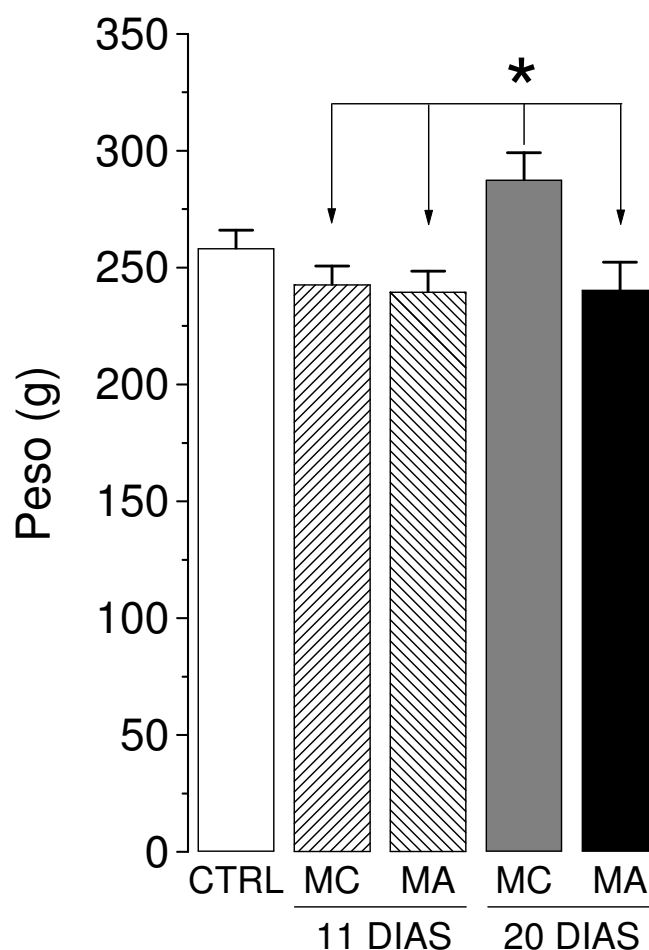


Figura 9. Efeitos da separação materna e do cuidado materno no peso de ratos adultos que foram submetidos à separação materna fictícia (controles) ou ao separação materna entre PN4-PN14 (11 dias) ou PN2-PN21 (20 dias). * $P < 0.05$, estatisticamente diferente das colunas indicadas pelas setas (ANOVA de uma via seguida de testes-t de Bonferroni).

Efeitos da SM e cuidado materno sobre o pânico experimental à estimulação elétrica da matéria cinzenta periaquedutal.

Os grupos apresentaram limiares significativamente diferentes para exoftalmia ($F_{4,71} = 2,56$; $P < 0,05$), imobilidade ($F_{4,68} = 4,02$; $P < 0,005$) e trote

($F_{4,69} = 2,99$; $P < 0,05$) (Fig.10). Estes efeitos foram devidos aos limiares mais elevados do grupo MC/21 tanto para imobilidade quanto para o trote, ou aos limiares mais reduzidos do grupo MA/21 para exoftalmia.

Tabela 2. Sumário da ANOVA de duas vias dos efeitos do cuidado materno e do período de separação materna sobre os limiares das respostas de pânico experimental dos grupos submetidos à separação materna. Os limiares de defecação, micção e salto não apresentaram alterações significativas.

Resposta	Fonte de Variação	F	P <
Imobilidade	Cuidado materno	1,68	ns
	Período de separação	4,78	0,05
	Cuidado materno*Período de separação	7,84	0,01
Exoftalmia	Cuidado materno	2,04	ns
	Período de separação	0	ns
	Cuidado materno*Período de separação	7,38	0,01
Trote	Cuidado materno	0,40	ns
	Período de separação	7,22	0,01
	Cuidado materno*Período de separação	4,84	0,05
Galope	Cuidado materno	1,08	ns
	Período de separação	4,32	0,05
	Cuidado materno*Período de separação	2,54	ns

ns - não significante.

A ANOVA de duas vias (ratos submetidos a separação materna) mostrou diferenças significantes dos limiares para exoftalmia ($F_{3,58} = 3,22$; $P < 0,05$), imobilidade ($F_{3,57} = 5,32$; $P < 0,005$), trote ($F_{3,57} = 4,54$; $P < 0,01$) e galope ($F_{3,52} = 2,88$; $P < 0,05$) (Fig.10). Estes efeitos foram devidos exclusivamente ao período de separação (galope) ou à interação período*cuidado materno (exoftalmia), ou ao período e à interação período*cuidado materno (imobilidade e trote) (Tabela 2).

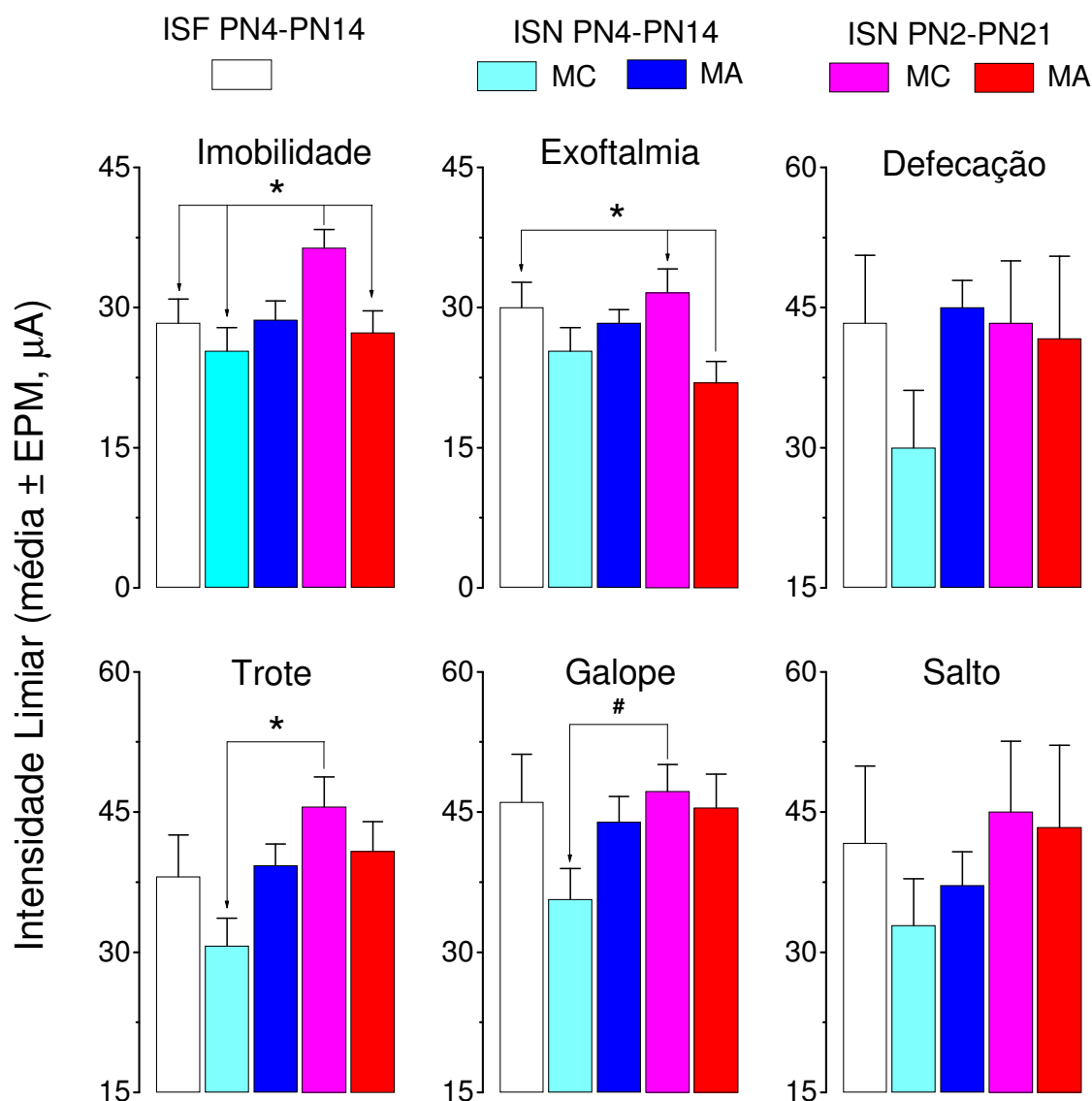


Figura 10. Efeitos da separação materna e do cuidado materno no pânico experimental produzido pela estimulação da matéria cinzenta periaquedutal de ratos adultos. Os símbolos indicam diferenças significantes dos grupos assinalados em relação aos grupos indicados pelas setas em testes *post hoc* de Bonferroni ($P < 0,05$) para a ANOVA de 1 via de todos os grupos (*) ou para a ANOVA de 2 vias somente dos grupos submetidos à SM (#). Demais detalhes como na Fig.5.

DISCUSSÃO

Devido à atenção quase exclusiva das mães aos filhotes recém reunidos à ninhada, não houve comportamento de transporte dos filhotes não-separados em PN2 e PN3. No período PN4-PN6, o transporte dos filhotes não-separados também foi menor que aquele dos filhotes do grupo SM/11 . Por outro lado, o transporte foi virtualmente abolido após PN17. Embora a análise estatística possa ter sido comprometida pelo número pequeno de proles do grupo SMF (n=2) e pelo período curto de observação (5 min), estes resultados sugerem que as mães despendem um tempo maior no transporte dos filhotes separados que dos não-separados, principalmente, entre PN2 e PN6. Por outro lado, é interessante notar que o comportamento de transporte coincide com o SHRP, sendo significativamente reduzido após PN10 e praticamente abolido após PN17.

A despeito dos dados contrários da literatura (Wigger e Neumann, 1999; Huot et al., 2002; Daniels et al., 2004; Pascual e Zamora-Leon, 2007), nossos resultados mostram que nem a SM por 3 h diárias (no SHRP ou ao longo de toda a lactação), nem a ausência de cuidados maternos no momento da reunião, tiveram efeito algum nos índices basais de ansiedade de ratos expostos ao LCE e CA quando adultos. Entretanto, nossos resultados estão de acordo com inúmeros relatos da ausência de efeitos da SM de 3 h diárias em vários modelos de ansiedade (medo condicionado, novidade, odor de predador, estresse de restrição, interação social), tanto em camundongos (Savignac et al., 2011) como em ratos (McIntosh et al., 1999; Caldji et al., 2000; Greisen et al., 2005; Park et al., 2005; Hulshof et al., 2011). A ausência de efeitos da SM no LCE também concorda com os resultados do LCE no estudo recente de

nosso laboratório que empregou o ISN de 3 h diárias ao longo de toda lactação (Quintino-dos-Santos et al., 2014). Notavelmente, filhotes privados do cuidado materno de ambos os períodos de separação apresentaram até mesmo uma redução significativa da defecação no CA. Tradicionalmente, a diminuição da defecação no CA é interpretada como uma redução da “reatividade emocional” ou até mesmo da ansiedade (Gray, 1991). Contudo, como não foram observados efeitos ansiolíticos no LCE e CA, a redução da defecação pode ser devida ao aumento da resiliência ao estresse dos ratos que foram privados da atenção materna no momento seguinte à reunião à ninhada.

Em contraste, o período da separação interagiu de forma complexa com o cuidado materno no teste da NF. Assim, enquanto a comparação dos controles aos grupos separados por 11 dias sugere que o cuidado materno reduz a resiliência à NF, a comparação dos controles aos grupos separados por 20 dias sugere o oposto. Embora o aumento da resiliência à NF no grupo MC-20D esteja de acordo com o estudo recente de nosso laboratório (Quintino-dos-Santos et al., 2014) no qual os filhotes foram submetidos ao ISN de 3 h diárias ao longo da lactação, o último estudo relatou uma redução idêntica do tempo de flutuação (imobilidade) nos grupos submetidos a separação materna fictícia (apenas manipulados) ou real (separação por 3 h diárias) comparados aos controles não-manipulados e não-separados. Conclui-se, portanto, que o aumento da resiliência do estudo de Quintino-dos-Santos et al. (2014) foi devido à manipulação e não ao ISN propriamente dito. Ao contrário, no presente estudo o tempo de natação variou em sentidos opostos para separações de 11 e 20 dias, independentemente do manejo similar de todos os filhotes submetidos à SM. Também é importante notar que a SM no SHRP

facilitou índices completamente diversos de depressão, quais sejam, anedonia (TCS) e imobilidade (NF), supostamente, representativos dos sintomas dos pacientes depressivos de falta de prazer e de dificuldade em lidar com o estresse. Como estes comportamentos são mediados por sistemas efetores completamente distintos, a facilitação de ambos os índices é altamente sugestiva de um efeito pró-depressivo.

Também houve interações significativas do período da separação com o cuidado materno no TA. Mais notavelmente, a frequência de lambidas da solução de sacarose foi seletivamente aumentada no grupo MC-20, endossando o aumento da resiliência deste grupo na NF. Quando adultos, os ratos do grupo MC-20 também apresentaram pesos maiores que os demais, incluindo os controles não-separados, sugerindo o aumento do apetite dos primeiros. No conjunto, os resultados da NF, TA e ganho de peso sugerem que os filhotes submetidos a 3 h diárias ao longo da lactação que foram reunidos a mães conscientes apresentam traços menores de depressão. Em contraste, filhotes submetidos a 3 h diárias de separação no período hiporresponsivo ao estresse desenvolvem traços mais acentuados de depressão.

O período de separação e cuidado materno também tiveram efeitos diferenciados sobre os limiares das respostas de pânico experimental à estimulação elétrica da MCPA. Em geral, os limiares mais elevados foram observados para o grupo MC-20, enquanto os menores foram observados para o grupo MC-11. A ANOVA de 2 vias mostrou que embora o cuidado materno não tenha influído significativamente na imobilidade e trote, ele apresentou forte interação com o período de privação. Mais importante o comportamento de fuga (trote, galopes e/ou saltos), presumivelmente, o melhor representante

dos AP (Schenberg et al., 2001, 2010, 2014), foi facilitado no grupo MC-11 em relação ao grupo MC-20. Em particular, o galope só foi influenciado pelo período de separação. Por fim, é importante notar que embora as respostas de salto e defecação tenham apresentado perfis similares aos das respostas de trote e galope, as diferenças não atingiram significância estatística devido à maior variabilidade dos limiares destas respostas. Estes resultados sugerem que a separação durante o período hiporresponsivo facilita os AP em ratos adultos, enquanto a separação ao longo de todo período da lactação inibe estas respostas. O estudo contraditório de Quintino-dos-Santos (2014), no qual os limiares do pânico foram acentuadamente facilitados em ratos submetidos ao ISN de 20 dias, reforça a suspeita de que aqueles resultados tenham sido devidos à interação do ISN com o estresse da ampla craniotomia para exposição do seio venoso e do período insuficiente de recuperação cirúrgica (5-7 dias) em gaiolas de vidro individuais.

Inúmeras evidências sugerem que a separação materna de ratos recém-nascidos produz comportamentos de ansiedade e depressão na idade adulta. (Plotsky e Meaney, 2001; Huot et al., 2001; Pryce e Feldon, 2003; Lee et al., 2007; Aisa et al., 2008; Marais et al., 2008; Lambás-Señas et al., 2009). Mudanças similares têm sido observadas em ratos cujas mães apresentam cuidado materno reduzidos (Meaney, 2011). Contudo, nossos resultados mostraram que o aumento da vulnerabilidade à depressão e pânico depende, principalmente, do período da separação materna, mas também da interação deste com o cuidado materno.

Conforme já ressaltamos quanto ao LCE, a literatura sobre efeitos tardios do estresse de separação é altamente contraditória. Os resultados

inconsistentes podem ser devidos à enorme variedade de procedimentos rotulados como “separação materna” (Lehmann e Feldon, 2000). De fato, enquanto períodos curtos (3-15 min) de separação, comumente denominados como “manuseio” (*handling*), reduziram as respostas comportamentais e endócrinas aos estressores na idade adulta (Meaney et al., 1996, 1992), períodos prolongados (3-6 h) aumentaram estas respostas (Plotsky e Meaney, 1993; Francis e Meaney, 1999). Outros fatores que podem ter contribuído para os relatos contraditórios da literatura são condições individuais ou coletivas de separação maternal ou crescimento dos animais.

Schoenfeld et al., 1980, também mostraram que enquanto o eixo HHA dos ratos não responde aos estressores nas duas primeiras semanas de vida, que ele denominou “período hiporresponsivo ao estresse” (SHRP, *stress hyporesponsive period*), ele torna-se responsivo se os filhotes forem submetidos à privação materna de 24 h num único dia deste período. Levine e colaboradores também mostraram que as respostas ao estresse são mínimas ou inexistentes no SHRP devido aos estímulos maternos, tais como o contato passivo, alimentação e estimulação anogenital (Suchecki et al., 1993a,b, 1995; Levine, 2001). Por outro lado, é bem conhecido que o manuseio diário dos ratos durante o período neonatal atenua a ativação do eixo HHA em ratos adultos (Levine, 2005, 1957; Meaney et al., 1985; Meerlo et al., 1999), reduz o desempenho emocional (Meerlo et al., 1999) e melhora a cognição (Meaney et al., 1988). Essas alterações podem ser mediadas pelo aumento do cuidado maternal como resultado da manipulação diária (Denenberg, 1999; Pryce et al., 2001).

CONCLUSÕES

Em resumo, nossos dados mostram que (i) a SM não teve efeito algum sobre os níveis de ansiedade de ratos adultos expostos ao LCE e CA; (ii) a SM no SHRP aumentou os índices de depressão de ratos adultos expostos à NF e TA, (iii) a SM no SHRP facilitou o pânico experimental nos ratos adultos, (iv) a SM ao longo da lactação aumentou índices de prazer e resiliência de ratos adultos no TA e NF, respectivamente, (v) a SM ao longo da lactação resultou em ganhos maiores de peso, (vi) o cuidado materno no momento da reunião teve efeitos pequenos isoladamente, mas potencializou a facilitação tanto do pânico como da depressão dos ratos submetidos à SM no SHRP. Nossos dados sugerem que os efeitos da SM dependem fortemente do período em que ela foi realizada. Como os grupos reunidos a mães anestesiadas apresentaram efeitos similares em todos os testes, serão necessários estudos adicionais para avaliar os eventuais efeitos do anestésico transmitido à prole via amamentação. Caso contrário, nossos resultados sugerem que os efeitos diferenciais do período da SM (11 ou 20 dias) dependem do comportamento acentuado da atenção da mãe aos filhotes durante o SHRP. Por fim, este é o primeiro estudo sobre os efeitos da negligência materna no momento do retorno do filhote isolado à ninhada sobre a ansiedade, depressão e pânico experimentais na vida adulta.

REFERÊNCIAS

- Aisa B, Tordera R, Lasheras B, Río J Del, Ramírez MJ (2008). Effects of maternal separation on hypothalamic-pituitary-adrenal responses, cognition and vulnerability to stress in adult female rats. *Neuroscience* 154: 1218–1226.
- Albano AM, Chorpita BR, Barlow DH (1996). Childhood anxiety disorders. *Child psychopathology* 196–241
- Angst J, Wick W (1993). The epidemiology of frequent and less frequent panic attacks. *Psychopharmacology of Panic* 7–24.
- APA (American Association Psychiatry: Washington, DC, (1980). *DSM-III: Diagnostic and Statistical Manual for Mental Disorders of American Psychiatric Association*.
- APA (American Psychiatry Association: Washington, DC, 2000). *DSM-IV-TR: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders of American Psychiatric Association*. 943.
- Arborelius L, Hawks BW, Owens MJ, Plotsky PM, Nemeroff CB (2004). Increased responsiveness of presumed 5-HT cells to citalopram in adult rats subjected to prolonged maternal separation relative to brief separation. *Psychopharmacology* 176: 248–255.
- Aydemir O, Deveci A, Taneli F (2005). The effect of chronic antidepressant treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients: a preliminar study. *Biological Psychiatry* 29, 261-265
- Bandler R, Carrive P, Depaulis A (1991). Emerging principles of organization in the midbrain periaqueductal gray matter. *The midbrain periaqueductal gray matter: functional, anatomical and neurochemical organization* 1–8.

- Battaglia M, Bertella S, Politi E, Bernardeschi L, Perna G, Gabriele A, *et al* (1995). Age at onset of panic disorder: influence of familial liability to the disease and of childhood separation anxiety disorder. *The American journal of psychiatry* 152: 1362–1364.
- Bavis RW, Mitchell GS (2008). Long-term effects of the perinatal environment on respiratory control. *Journal of Applied Physiology* 104: 1220–1209.
- Bell-Dolan D (1995). Separation anxiety disorder. *Handbook of child behavior therapy in the psychiatric settings* 217–298.
- Bernstein GA, Borchardt CM (1996). School refusal: Family constellation and family functioning. *Journal of Anxiety Disorders* 10: 1–19.
- Bernstein GA, Borchardt CM, Perwien AR, Crosby RD, Kushner MG, Thuras PD, *et al* (2000). Imipramine plus cognitive-behavioral therapy in the treatment of school refusal. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* 39: 276–283.
- Biederman J, Petty C, Faraone S V, Ph D, Hirshfeld-becker DR, Henin A, *et al* (2005). Childhood antecedents to panic disorder in referred and nonreferred adults. *Journal of Child and Adolescent Psychopharmacology* 15: 549–561.
- Biederman J, Petty CR, Hirshfeld-Becker DR, Henin A, Faraone S V, Fraire M, *et al* (2007). Developmental trajectories of anxiety disorders in offspring at high risk for panic disorder and major depression. *Psychiatry Research* 153: 245–252.
- Bittencourt AS, Carobrez A de P, Zamprogno LP, Tufik S, Schenberg LC (2004). Organization of single components of defensive behaviors within

distinct columns of Periaqueductal Gray Matter of the rat: role of N-Methyl-D-aspartic Acid glutamate receptors. *Neuroscience* 125: 71–89.

Bittencourt AS, Nakamura-Palacios EM, Mauad H, Schenberg LC (2005).

Organization of electrically and chemically evoked defensive behaviors within the Deeper Collicular Layers as compared to the Periaqueductal Gray Matter of the rat. *Neuroscience* 133: 873–892.

Black B (1995). Anxiety disorders in children and adolescents. *Separation anxiety disorder and panic disorder* 212–234.

Blaymore Bier J a., Ferguson a. E, Morales Y, Liebling J a., Oh W, Vohr BR (1997). Breastfeeding Infants Who Were Extremely Low Birth Weight. *Pediatrics* 100: E3.

Bowlby, J., 1973. Attachment, 2nd ed. Basic Books, New York, NY.

Bowlby, J., 1973. Separation, Anxiety and Anger., 2nd ed. Basic Books, New York, NY.

Boyd CP, Kostanski M, Gullone E, Ollendick TH, Shek DT (2000). Prevalence of anxiety and depression in Australian adolescents: comparisons with worldwide data. *The Journal of Genetic Psychology* 161: 479–492.

Bretherton I (1992). The origins of attachment theory: John Bowlby and Mary Ainsworth. *Developmental psychobiology* 28: 759–775.

Brown KJ, Grunberg NE (1995). Effect of housing on male and female rats: crowding stresses males but calms females. *Physiology and Behavior* 58: 1085–1089.

Brown TA, Barlow DH (1992). Comorbidity among anxiety disorders: implications for treatment and DSM-IV. *Journal of Consulting and Clinical Psychology* 60: 835–844.

- Burgess ML, Davis JM, Wilson SP, Borg TK, Burgess WA, Buggy J (1993). Effects of intracranial self-stimulation on selected physiological variables in rats. *The American Journal of Physiology* 264: 149–155.
- Caldji C, Diorio J, Meaney MJ. (2000) Variations in maternal care in infancy regulate the development of stress reactivity. *Biol Psychiatry* 48:1164-74.
- Carrive P (1993). The periaqueductal gray and defensive behavior: functional representation and neuronal organization. *Behavioural Brain Research* 58: 27–47.
- Cartwright-Hatton S, McNicol K, Doubleday E (2006). Anxiety in a neglected population: prevalence of anxiety disorders in pre-adolescent children. *Clinical psychology Review* 26: 817–833.
- Cayetanot F, Larnicol N, Peyronnet J (2009). Antenatal environmental stress and maturation of the breathing control , experimental data. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 168: 92–100.
- Chao M.V. (2003). Neurotrophins and their receptors: a converge point for many signaling pathways. *Nature Reviews Neuroscience* 4,199-309.
- Chapman WP, Schroeder HR, Geyer G, Brazier MA, Fager C, Poppen JL, *et al* (1954). Physiological evidence concerning importance of the amygdaloid nuclear region in the integration of circulatory function and emotion in man. *Science* 120: 949–950.
- Charney DS, Manji HK (2004). Life stress, genes, and depression: multiple pathways lead to increased risk and new opportunities for intervention. *Science's STKE* 2004: re5.
- Cirulli F, Berry A, Bonsignore LT, Capone F, D'Andrea I, Aloe L, *et al* (2010). Early life influences on emotional reactivity: evidence that social

enrichment has greater effects than handling on anxiety-like behaviors, neuroendocrine responses to stress and central BDNF levels. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 34: 808–820.

Cohen ME, White PD (1951). Life situations, emotions, and neurocirculatory asthenia (anxiety neurosis, neurasthenia, effort syndrome). *Psychosomatic Medicine* 13: 335–357.

Costello EJ, Mustillo S, Erkanli A, Keeler G, Angold A (2003). Prevalence and development of psychiatric disorders in childhood and adolescence. *Archives of General Psychiatry* 60: 837–844.

Daniels WM, Pietersen CY, Carstens ME, Stein DJ (2004) Maternal separation in rats leads to anxiety-like behavior and a blunted ACTH response and altered neurotransmitter levels in response to a subsequent stressor. *Metab Brain Dis* 19:3-14.

David DJ, Wang J, Samuels BA, Rainer Q, David I, Gardier AM, *et al* (2010). Implications of the functional integration of adult-born hippocampal neurons in anxiety-depression disorders. *The Neuroscientist* 16: 578–591.

De Souza Armini R, Bernabé CS, Rosa CA, Siller CA, Schimitel FG, Tufik S, Klein DF, Schenberg LC. (2015). In a rat model of panic, corticotropin responses to dorsal periaqueductal gray stimulation depend on physical exertion. *Psychoneuroendocrinology*, 53:136-47.

Deakin JWF, Graeff FG (1991). 5-HT and mechanisms of defense. *Journal of Psychopharmacology* 5: 305–315.

Devries AC, Glasper ER, Detillion CE (2003). Social modulation of stress responses. *Physiology and Behavior* 79: 399–407.

- Dorow R, Horowski R, Paschelke G, Amin M (1983). Severe anxiety induced by FG 7142, a beta-carboline ligand for benzodiazepine receptors. *Lancet* 2: 98–99.
- Droste SK, Gesing A, Ulbricht S, Mu MB, Linthorst ACE, Reul JMHM (2003). Effects of Long-Term Voluntary Exercise on the Mouse Hypothalamic-Pituitary-Adrenocortical Axis. *Endocrinology* 144: 3012–3023.
- Dumont FS, Kinkead R (2010). Neonatal stress and attenuation of the hypercapnic ventilatory response in adult male rats: the role of carotid chemoreceptors and baroreceptors. *American Journal of Physiology* 299: R1279–1289.
- Eklund MB, Arborelius L (2006). Twice daily long maternal separations in Wistar rats decreases anxiety-like behaviour in females but does not affect males. *Behavioural Brain Research* 172: 278–285.
- Epp JR, Spritzer MD, Galea LAM (2007). Hippocampus-dependent learning promotes survival of new neurons in the dentate gyrus at a specific time during cell maturation. *Neuroscience* 149: 273–285.
- Essau CA, Conradt J, Petermann F (2000). Frequency, comorbidity, and psychosocial impairment of anxiety disorders in German adolescents. *Journal of Anxiety Disorders* 14: 263–279.
- Faravelli C, Pallanti S (1989). Recent life events and panic disorder. *The American Journal of Psychiatry* 146: 622–626.
- Floyd NS, Price JL, Ferry AT, Keay KA, Bandler R (2000). Orbitomedial prefrontal cortical projections to distinct longitudinal columns of the periaqueductal gray in the rat. *The Journal of Comparative Neurology* 422: 556–578.

- Fournier S, Joseph V, Kinkead R (2011). Influence of juvenile housing conditions on the ventilatory , thermoregulatory , and endocrine responses to hypoxia of adult male rats. *Journal of Applied Physiology* 516–523doi:10.1152/japplphysiol.00370.2011.
- Fournier S, Kinkead R, Joseph V (2013). Influence of housing conditions from weaning to adulthood on the ventilatory , thermoregulatory , and endocrine responses to hypoxia of adult female rats. *Journal of Applied Physiology* 1474–1481doi:10.1152/japplphysiol.01477.2011.
- Francis DD, Meaney MJ (1999). Maternal care and the development of stress responses. *Current Opinion in Neurobiology* 9: 128–134.
- Francis G, Last CG, Strauss CC (1987). Expression of separation anxiety disorder: the roles of age and gender. *Child Psychiatry and Human Development* 18: 82–89.
- Freud S (1895). On the right to separate from neurasthenia a definite symptom-complex as “anxiety neurosis” (Angstneurose). In “Selected writings on hysteria”, cap. 6, *The major works of Sigmund Freud (Great Books of Western World)* pp. 87-97.
- Freud S (1905). Three essays on the theory of sexuality, In Standard Edition of “The Complete Psychological Works of Sigmund Freud”, Hogarth Press Ltd, Londres, 7: 135-243.
- Freud S (1917). Introductory lectures on psycho-analysis, In Standard Edition of “The Complete Psychological Works of Sigmund Freud”, Hogarth Press Ltd, Londres, Part III, 16.

- Freud S (1926). Inhibitions, symptoms and anxiety, In Standard Edition of “The Complete Psychological Works of Sigmund Freud”, Hogarth Press Ltd, Londres, 20: 87-172.
- Galler JR, Seelig C (1981). Home-orienting behavior in rat pups: the effect of 2 and 3 generations of rehabilitation following intergenerational malnutrition. *Developmental psychobiology* 14: 541–548.
- Genest S-E, Balon N, Laforest S, Drolet G, Kinkead R (2007a). Neonatal maternal separation and enhancement of the hypoxic ventilatory response in rat: the role of GABAergic modulation within the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *The Journal of Physiology* 583: 299–314.
- Genest S-E, Gulemetova R, Laforest S, Drolet G, Kinkead R (2004). Neonatal maternal separation and sex-specific plasticity of the hypoxic ventilatory response in awake rat. *The Journal of Physiology* 554: 543–557.
- Genest S-E, Gulemetova R, Laforest S, Drolet G, Kinkead R (2007b). Neonatal maternal separation induces sex-specific augmentation of the hypercapnic ventilatory response in awake rat. *Journal of Applied Physiology* 102: 1416–1421.
- Gentil V (1988). The aversive System, 5-HT and panic attacks. *Animal Models of Psychiatric Disorders* 142–145.
- Gittelman-Klein R (1995). Is panic disorder associated with childhood separation anxiety disorder? *Clinical Neuropharmacology* 18: 7–14.
- Gittelman-Klein R, Klein DF (1973). School phobia: diagnostic considerations in the light of imipramine effects. *The Journal of Nervous and Mental Disease* 156: 199–215.

- Gonul AS, Akdeniz F, Taneli F, Donat, O, Eker C, Vahip S. (2005). Effect of treatment on serum brain-derived neurotrophic factor levels in depressed patients. *European archives of psychiatry and clinical neuroscience* 6, 255-381
- Goodwin GA, Barr GA (2005). Developmental changes in the behavioral and autonomic effects of kappa opioid receptor stimulation of the midbrain periaqueductal gray. *Developmental Psychobiology* 46: 47–56.
- Goodwin RD (2002). Anxiety disorders and the onset of depression among adults in the community. *Psychological Medicine* 32: 1121–1124.
- Goodwin RD, Lieb R, Hoefler M, Pfister H, Bittner A, Beesdo K, *et al* (2004). Panic attack as a risk factor for severe psychopathology. *The American Journal of Psychiatry* 161: 2207–2214.
- Gorman JM, Browne ST, Papp LA, Martinez J, Welkowitz L, Coplan JD, *et al* (1997). Effect of antipanic treatment on response to carbon dioxide. *Biological Psychiatry* 42: 982–991.
- Gorman JM, Liebowitz MR, Fyer AJ, Goetz D, Campeas RB, Fyer MR, *et al* (1987). An open trial of fluoxetine in the treatment of panic attacks. *Journal of Clinical Psychopharmacology* 7: 329–332.
- Gould E, Beylin A, Tanapat P, Reeves A, Shors TJ (1999). Learning enhances adult neurogenesis in the hippocampal formation. *Nature Neuroscience* 2: 260–265.
- Graeff FG (1988). Animal models of aversion. *Selected models of anxiety, depression and psychosis* 115–141.
- Graeff FG (2003). 5-HT, matéria cinzenta periaquedutal e transtorno do pânico. *Revista Brasileira de Psiquiatria* 42–45.

- Graeff FG (2004). Serotonin, the periaqueductal gray and panic. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 28: 239–259.
- Graeff FG, Garcia-Leal C, Del-Ben CM, Guimarães FS (2005). Does the panic attack activate the hypothalamic-pituitary-adrenal axis? *Annals of the Brazilian Academy Sciences* 77: 477–491.
- Gray JA (1991) *The Psychology of Fear and Stress*. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Greisen MH, Bolwig TG, Wörtwein G, Gitta W (2005). Cholecystokinin tetrapeptide effects on HPA axis function and elevated plus maze behaviour in maternally separated and handled rats. *Behavioural Brain Research* 161: 204–212.
- Heath RG (1975). Brain function and behavior. I. Emotion and sensory phenomena in psychotic patients and in experimental animals. *The Journal of Nervous and Mental Disease* 160: 159–175.
- Hofer MA (1996). Multiple regulators of ultrasonic vocalization in the infant rat. *Psychoneuroendocrinology* 21: 203–217.
- Hollander E, Liebowitz MR, Cohen B, Gorman JM, Fyer AJ, Papp LA, *et al* (1989a). Prolactin and sodium lactate-induced panic. *Psychiatry Research* 28: 181–191.
- Hulshof HJ, Novati A, Sgoifo A, Luiten PG, Den Boer JA, Meerlo P (2011). Maternal separation decreases adult hippocampal cell proliferation and impairs cognitive performance but has little effect on stress sensitivity and anxiety in adult Wistar rats. *Behav Brain Res* 216:552-60.
- Huot RL, Thiruvikraman K V, Meaney MJ, Plotsky PM (2001). Development of adult ethanol preference and anxiety as a consequence of neonatal

- maternal separation in Long Evans rats and reversal with antidepressant treatment. *Psychopharmacology* 158: 366–373.
- Huot RL, Plotsky PM, Lenox RH, McNamara RK (2002) Neonatal maternal separation reduces hippocampal mossy fiber density in adult Long Evans rats. *Brain Res* 950: 52-63.
- Jenck F, Moreau JL, Martin JR (1995). Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a simulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. *Psychiatry Research* 57: 181–191.
- Kagan J, Reznick JS, Snidman N, Gibbons J, Johnson MO (1988). Childhood derivatives of inhibition and lack of inhibition to the unfamiliar. *Child Development* 59: 1580–1589.
- Kapelewski CH, Bennett JM, Cavigelli SA, Klein LC. (2010). Application Of A Naturalistic Psychogenic Stressor In Periadolescent Mice: Effect On Serum Corticosterone Levels Differs By Strain But Not Sex. *BMC Res Notes*. 3: 170.
- Kaunonen M, Päivi AK, Paunonen M, Erjanti H (2000). Death in the Finnish family: experiences of spousal bereavement. *International Journal of Nursing Practice* 6: 127–134.
- Kempermann G, Kuhn HG, Gage FH (1997). More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386: 493–495.
- Kinkead R, Montandon G, Bairam A, Lajeunesse Y, Horner R (2009). Neonatal maternal separation disrupts regulation of sleep and breathing in adult male rats. *Sleep* 32: 1611–1620.
- Klein DF (1964). Delineation of Two Drug-Responsive Anxiety Syndromes. *Psychopharmacologia* 5: 397–408.

- Klein DF (1980). Anxiety reconceptualized. *Comprehensive Psychiatry* 21: 411–427.
- Klein DF (1993). Panic disorder with agoraphobia. *The British journal of psychiatry: the journal of mental science* 163: 835–837.
- Klein DF, Fink M (1962). Psychiatric reaction patterns to imipramine. *The American Journal of Psychiatry* 119: 432–438.
- Klein S, Nicolas LB, Lopez-Lopez C, Jacobson LH, McArthur SG, Grundschober C, *et al* (2010). Examining face and construct validity of a noninvasive model of panic disorder in Lister-hooded rats. *Psychopharmacology* 211: 197–208.
- Konkle ATM, Kentner AC, Baker SL, Stewart A, Bielajew C (2010). Environmental-enrichment-related variations in behavioral, biochemical, and physiologic responses of Sprague-Dawley and Long Evans rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 49: 427–436.
- Kuhn CM, Pauk J, Schanberg SM (1990). Endocrine responses to mother-infant separation in developing rats. *Developmental psychobiology* 23: 395–410.
- Kuhn CM, Schanberg SM (1998). Responses to maternal separation: mechanisms and mediators. *International Journal of Developmental Neuroscience* 16: 261–270.
- Lambás-Señas L, Mnie-Filali O, Certin V, Faure C, Lemoine L, Zimmer L, *et al* (2009). Functional correlates for 5-HT(1A) receptors in maternally deprived rats displaying anxiety and depression-like behaviors. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 33: 262–268.

- Last CG (1991). Somatic Complaints in Anxiety Disordered Children. *Journal of Anxiety Disorders* 5: 125–138.
- Lee J-H, Kim HJ, Kim JG, Ryu V, Kim B-T, Kang D-W, *et al* (2007). Depressive behaviors and decreased expression of serotonin reuptake transporter in rats that experienced neonatal maternal separation. *Neuroscience Research* 58: 32–39.
- Lehmann J, Feldon J (2000). Long-term biobehavioral effects of maternal separation in the rat: consistent or confusing? *Reviews in the Neurosciences* 11: 383–408.
- Leuner B, Caponiti JM, Gould E (2012). Oxytocin Stimulates Adult Neurogenesis Even Under Conditions of Stress and Elevated Glucocorticoids. *Hippocampus* 868: 861–868.
- Leuner B, Glasper ER, Gould E (2010). Sexual Experience Promotes Adult Neurogenesis in the Hippocampus Despite an Initial Elevation in Stress Hormones. *PLoS One* 5: e11597.
- Leuner B, Gould E (2010). Structural Plasticity and Hippocampal Function. *Annual Review of Psychology* 61: 111–140.
- Leuner B, Mendolia-loffredo S, Kozorovitskiy Y, Samburg D, Gould E, Shors TJ (2004). Learning Enhances the Survival of New Neurons beyond the Time when the Hippocampus Is Required for Memory. *The Journal of Neuroscience* 24: 7477–7481.
- Levin AP, Doran AR, Liebowitz MR, Fyer AJ, Gorman JM, Klein DF, *et al* (1987). Pituitary adrenocortical unresponsiveness in lactate-induced panic. *Psychiatry Research* 21: 23–32.

- Levine S (2005). Developmental determinants of sensitivity and resistance to stress. *Psychoneuroendocrinology* 30: 939–946.
- Liebowitz MR, Fyer AJ, Gorman JM, Dillon D, Appleby IL, Levy G, *et al* (1984). Lactate provocation of panic attacks. I. Clinical and behavioral findings. *Archives of General Psychiatry* 41: 764–770.
- Liebowitz MR, Gorman JM, Fyer AJ, Levitt M, Dillon D, Levy G, *et al* (1985b). Lactate provocation of panic attacks. II. Biochemical and physiological findings. *Archives of General Psychiatry* 42: 709–719.
- Lim LW, Blokland A, Duinen M van, Visser-Vandewalle V, Tan S, Vlamings R, *et al* (2010). Increased plasma corticosterone levels after periaqueductal gray stimulation-induced escape reaction or panic attacks in rats. *Behavioural Brain Research* 218: 301–307.
- Ludington-Hoe SM, Ferreira CN, Goldstein MR (1998). Kangaroo care with a ventilated preterm infant. *Acta Paediatrica* 87: 711–713.
- Manicavasagar V, Silove D, Marnane C, Wagner R (2009). Adult attachment styles in panic disorder with and without comorbid adult separation anxiety disorder. *The Australian and New Zealand Journal of Psychiatry* 43: 167–172.
- Marais L, Rensburg SJ Van, Zyl JM Van, Stein DJ, Daniels WMU (2008). Maternal separation of rat pups increases the risk of developing depressive-like behavior after subsequent chronic stress by altering corticosterone and neurotrophin levels in the hippocampus. *Neuroscience Research* 61: 106–112.
- Maslova LN, Bulygina V V., Amstislavskaya TG (2010). Prolonged social isolation and social instability in adolescence in rats: immediate and long-

term physiological and behavioral effects. *Neuroscience and Behavioral Physiology* 40: 955–963.

McIntosh J, Anisman H, Merali Z (1999) Short- and long-periods of neonatal maternal separation differentially affect anxiety and feeding in adult rats: gender-dependent effects. *Brain Res Dev Brain Res* 113:97-106.

Meaney MJ (2001). Maternal care, gene expression, and the transmission of individual differences in stress reactivity across generations. *Annual Review of Neuroscience* 24: 1161–1192.

Meaney MJ, Aitken DH, Berkel C van, Bhatnagar S, Sapolsky RM (1988). Effect of neonatal handling on age-related impairments associated with the hippocampus. *Science* 239: 766–768.

Meaney MJ, Aitken DH, Bodnoff SR, Iny LJ, Sapolsky RM (1985). The effects of postnatal handling on the development of the glucocorticoid receptor systems and stress recovery in the rat. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 9: 731–734.

Meaney MJ, Aitken DH, Sharma S, Viau V (1992). Basal ACTH, corticosterone and corticosterone-binding globulin levels over the diurnal cycle, and age-related changes in hippocampal type I and type II corticosteroid receptor binding capacity in young and aged, handled and nonhandled rats. *Neuroendocrinology* 55: 204–213.

Meaney MJ, Diorio J, Francis D, Widdowson J, LaPlante P, Caldji C, *et al* (1996). Early environmental regulation of forebrain glucocorticoid receptor gene expression: implications for adrenocortical responses to stress. *Developmental Neuroscience* 18: 49–72.

- Milrod B, Leon AC, Shear MK (2004). Can interpersonal loss precipitate panic disorder? *The American Journal of Psychiatry* 161: 758–759.
- Ming G-L, Song H (2011). Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron* 70: 687–702.
- Molina AF de, Hunsperger RW (1962). Organization of the subcortical system governing defence and flight reactions in the cat. *The Journal of Physiology* 160: 200–213.
- Nashold BS, Wilson WP, Slaughter DG (1969). Sensations evoked by stimulation in the midbrain of man. *Journal of Neurosurgery* 30: 14–24.
- Park HJ, Chae Y, Jang J, Shim I, Lee H, Lim S (2005). The effect of acupuncture on anxiety and neuropeptide Y expression in the basolateral amygdala of maternally separated rats. *Neurosci Lett* 377:179-184.
- Parmar VR, Kumar A, Kaur R, Parmar S, Kaur D, Basu S, *et al* (2009). Experience with Kangaroo mother care in a neonatal intensive care unit (NICU) in Chandigarh, India. *Indian journal of pediatrics* 76: 25–28.
- Pascual R, Zamora-Leon SP (2007). Effects of neonatal maternal deprivation and postweaning environmental complexity on dendritic morphology of prefrontal pyramidal neurons in the rat. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 67:471-479.
- Paxinos G, Watson C (Academic Press: San Diego, CA, 1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*.
- Pine DS, Klein RG, Coplan JD, Papp LA, Hoven CW, Martinez J, *et al* (2000). Differential carbon dioxide sensitivity in childhood anxiety disorders and nonill comparison group. *Archives of General Psychiatry* 57: 960–967.

- Pine DS, Klein RG, Roberson-Nay R, Mannuzza S, Moulton JL, Woldehawariat G, *et al* (2005). Response to 5% carbon dioxide in children and adolescents: relationship to panic disorder in parents and anxiety disorders in subjects. *Archives of General Psychiatry* 62: 73–80.
- Pitts FN, McClure JN (1967). Lactate metabolism in anxiety neurosis. *The New England Journal of Medicine* 277: 1329–1336.
- Plotsky PM, Meaney MJ (1993). Early, postnatal experience alters hypothalamic corticotropin-releasing factor (CRF) mRNA, median eminence CRF content and stress-induced release in adult rats. *Brain Research* 18: 195–200.
- Post RM. (2007). Role of BDNF in bipolar and unipolar disorder: clinical and theoretical implications. *Psychiatry Research* 41,
- Praag H van, Christie BR, Sejnowski TJ, Gage FH (1999). Running enhances neurogenesis , learning , and long-term potentiation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 13427–13431.
- Praag H van, Kempermann G, Gage FH (2000). Neural consequences of environmental enrichment. *Nature Reviews Neuroscience* 1: 191–198.
- Preter M, Klein DF (2008). Panic, suffocation false alarms, separation anxiety and endogenous opioids. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry* 32: 603–612.
- Preter M, Lee SH, Petkova E, Vannucci M, Kim S, Klein DF (2011). Controlled cross-over study in normal subjects of naloxone-preceding-lactate infusions; respiratory and subjective responses: relationship to

endogenous opioid system, suffocation false alarm theory and childhood parental loss. *Psychological Medicine* 41: 385–393.

Pryce CR, Feldon J (2003). Long-term neurobehavioural impact of the postnatal environment in rats: manipulations, effects and mediating mechanisms. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 27: 57–71.

Quintino-dos-Santos JW, Muller CJ, Bernabe CS, Rosa CA, Tufik S, Schenberg LC (2014). Evidence that the periaqueductal gray matter mediates the facilitation of panic-like reactions in neonatally-isolated adult rats. *PLoS ONE* 9(3):e90726.

Reiman EM, Raichle ME, Robins E, Mintun MA, Fusselman MJ, Fox PT, *et al* (1989). Neuroanatomical correlates of a lactate-induced anxiety attack. *Archives of General Psychiatry* 46: 493–500.

Rifkin A, Klein DF, Dillon D, Levitt M (1981). Blockade by imipramine or desipramine of panic induced by sodium lactate. *The American Journal of Psychiatry* 138: 676–677.

Roberson-Nay R, Eaves LJ, Hetttema JM, Kendler KS, Silberg JL (2012). Childhood separation anxiety disorder and adult onset panic attacks share a common genetic diathesis. *Depression and anxiety* 29: 320–327.

Roceri M, Hendriks W, Racagni G, Ellenbroek BA, Riva MA. (2002). Early maternal deprivation reduces the expression of BDNF and NMDA receptor subunits in rat hippocampus. *Molecular Psychiatry*. 7,609-16.

Ross HE, Young LJ (2009). Oxytocin and the neural mechanisms regulating social cognition and affiliative behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology* 30: 534–547.

- Roza SJ, Hofstra MB, Ende J van der, Verhulst FC (2003). Stable prediction of mood and anxiety disorders based on behavioral and emotional problems in childhood: a 14-year follow-up during childhood, adolescence, and young adulthood. *The American Journal of Psychiatry* 160: 2116–2121.
- Sahay A, Hen R (2007). Adult hippocampal neurogenesis in depression. *Nature Neuroscience* 10: 1110–1115.
- Savignac HM, Dinan TG, Cryan JF (2011) Resistance to early-life stress in mice: effects of genetic background and stress duration. *Front Behav Neurosci* 5:13
- Schenberg LC (2010). Towards a translational model of panic attack. *Psychology and Neuroscience* 3: 9–37.
- Schenberg LC, Schimitel FG, Armini RS, Bernabe CS, Rosa CA, Tufik S, Quintino-dos-Santos JW (2014). Translational approach to studying panic disorder in rats: hits and misses. *Neurosci Biobehav Rev* 46:472-496.
- Schenberg LC, Bittencourt AS, Sudré ECM, Vargas LC, Cristina E, Sudre M, *et al* (2001). Modeling panic attacks. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 25: 647–659.
- Schenberg LC, Capucho LB, Vatanabe RO, Vargas LC (2002). Acute effects of clomipramine and fluoxetine on dorsal periaqueductal grey-evoked unconditioned defensive behaviours of the rat. *Psychopharmacology* 159: 138–144.
- Schenberg LC, Graeff FG (1978). Role of the periaqueductal gray substance in the antianxiety action of benzodiazepines. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 9: 287–95.

- Schenberg LC, Póvoa RMF, Costa ALP, Caldellas A V, Tufik S, Bittencourt AS (2005). Functional specializations within the tectum defense systems of the rat. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* 29: 1279–1298.
- Schenberg LC, Reis AM Dos, Ferreira Póvoa RM, Tufik S, Silva SR (2008). A panic attack-like unusual stress reaction. *Hormones and Behavior* 54: 584–591.
- Schimitel FG, Almeida GM de, Pitol DN, Armini RS, Tufik S, Schenberg LC (2012). Evidence of a suffocation alarm system within the periaqueductal gray matter of the rat. *Neuroscience* 200: 59–73.
- Schimitel FG, Müller CJ, Tufik S, Schenberg LCJ. (2014). Evidence of a suffocation alarm system sensitive to clinically-effective treatments with the panicolytics clonazepam and fluoxetine. *Psychopharmacol Journal*. 28(12):1184-8.
- Schmidt-Hieber C, Jonas P, Bischofberger J (2004). Enhanced synaptic plasticity in newly generated granule cells of the adult hippocampus. *Nature* 429: 184–187.
- Schoenfeld NM, Leathem JH, Rabii J. (1980). Maturation of adrenal stress responsiveness in the rat. *Neuroendocrinology* 31(2):101-5.
- Schoenfeld TJ, Gould E (2012). Stress, stress hormones, and adult neurogenesis. *Experimental Neurology* 233: 12–21.
- Selye H (1936). A syndrome produced by diverse nocuous agents. *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences* 10: 230–231.
- Selye H (1950). Stress and the general adaptation syndrome. *British Medical Journal* 1: 1383–1392.

- Shalev U, Kafkafi N (2002). Repeated maternal separation does not alter sucrose-reinforced and open-field behaviors. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior* 73: 115–122.
- Shear K, Jin R, Ruscio AM, Walters EE, Kessler RC (2006). Prevalence and correlates of estimated DSM-IV child and adult separation anxiety disorder in the National Comorbidity Survey Replication. *The American Journal of Psychiatry* 163: 1074–1083.
- Shekhar A, Keim SR, Simon JR, McBride WJ (1996). Dorsomedial hypothalamic GABA dysfunction produces physiological arousal following sodium lactate infusions. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 55: 249–256.
- Silove D, Harris M, Morgan A, Boyce P, Manicavasagar V, Hadzi-Pavlovic D, *et al* (1995). Is early separation anxiety a specific precursor of panic disorder-agoraphobia? A community study. *Psychological Medicine* 25: 405–411.
- Silove D, Manicavasagar V (1993). Adults who feared school: is early separation anxiety specific to the pathogenesis of panic disorder? *Acta Psychiatrica Scandinavica* 88: 385–390.
- SucHECKI D, Rosenfeld P, Levine (1993). Maternal Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking. *Brain Research Dev.* 75(2): 185-92
- SucHECKI D, Rosenfeld P, Levine S. Maternal regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the infant rat: the roles of feeding and stroking (1993a). *Brain Res Dev Brain Res* Oct 15;75(2):185-92.

- Suchecki D, Mozaffarian D, Gross G, Rosenfeld P, Levine S (1993b). Effects of maternal deprivation on the ACTH stress response in the infant rat. *Neuroendocrinology* 57:204-212.
- Suchecki D, Nelson DY, Van OH, Levine S (1995). Activation and inhibition of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the neonatal rat: effects of maternal deprivation. *Psychoneuroendocrinology* 20:169-182.
- Sudré ECM, Barros MR, Sudré GN, Schenberg LC (1993). Thresholds of electrically induced defence reaction of the rat: short- and long-term adaptation mechanisms. *Behav Brain Res* 58:141-154.
- Takahashi T, Zhu Y, Hata T (2009). Intracranial self-stimulation enhances neurogenesis in hippocampus of adult mice and rats. *Neuroscience* 158: 402–411.
- Tonge B (1994). Separation anxiety disorder. *International handbook of phobic and anxiety disorders in children and adolescents* 145–167.
- Tsankova N, Renthal W, Kumar A, Nestler, EJ. (2007). Epigenetic regulation in psychiatric disorders. *Nature Reviews Neuroscience* 8, 355-67.
- Vargas LC (2002). Modelando os ataques de pânico: psicofarmacologia dos comportamentos defensivos inatos induzidos por estimulação elétrica da Matéria Cinzenta Periaquedutal Dorsal de ratos. 222.
- Wang J-W, David DJ, Monckton JE, Battaglia F, Hen R (2008). Chronic fluoxetine stimulates maturation and synaptic plasticity of adult-born hippocampal granule cells. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 1374–84.

- Warner-Schmidt JL, Duman RS (2006). Hippocampal neurogenesis: opposing effects of stress and antidepressant treatment. *Hippocampus* 16: 239–249.
- Weintraub A, Singaravelu J, Bhatnagar S (2010). Enduring and sex-specific effects of adolescent social isolation in rats on adult stress reactivity. *Brain Research* 1343: 83–92.
- Whitelaw A, Heisterkamp G, Sleath K, Acolet D, Richards M (1988). Skin to skin contact for and their mothers low birthweight infants and their mothers. *Archives of Disease in Childhood* 1377–1381.
- Wigger A, Neumann ID (1999) Periodic maternal deprivation induces gender-dependent alterations in behavioral and neuroendocrine responses to emotional stress in adult rats. *Physiol Behav* 66:293-302.
- Will B, Galani R, Kelche C, Rosenzweig MR (2004). Recovery from brain injury in animals: relative efficacy of environmental enrichment, physical exercise or formal training (1990-2002). *Progress in Neurobiology* 72: 167–182.
- Wittchen HU, Nelson CB, Lachner G (1998). Prevalence of mental disorders and psychosocial impairments in adolescents and young adults. *Psychological Medicine* 28: 109–126.
- Woods SW, Charney DS, Delgado PL, Heninger GR (1990). The effect of long-term imipramine treatment on carbon dioxide-induced anxiety in panic disorder patients. *The Journal of Clinical Psychiatry* 51: 505–507.
- Woods SW, Charney DS, Goodman WK, Heninger GR (1988). Carbon dioxide-induced anxiety. Behavioral, physiologic, and biochemical effects of carbon dioxide in patients with panic disorders and healthy subjects. *Archives of General Psychiatry* 45: 43–52.

Woods SW, Charney DS, McPherson CA, Gradman AH, Heninger GR (1987).

Situational panic attacks. Behavioral, physiologic, and biochemical characterization. *Archives of General Psychiatry* 44: 365–375.

Yeragani VK, Pohl R, Balon R, Rainey JM, Berchou R, Ortiz A (1988). Sodium

lactate infusions after treatment with tricyclic antidepressants: behavioral and physiological findings. *Biological Psychiatry* 24: 767–774.